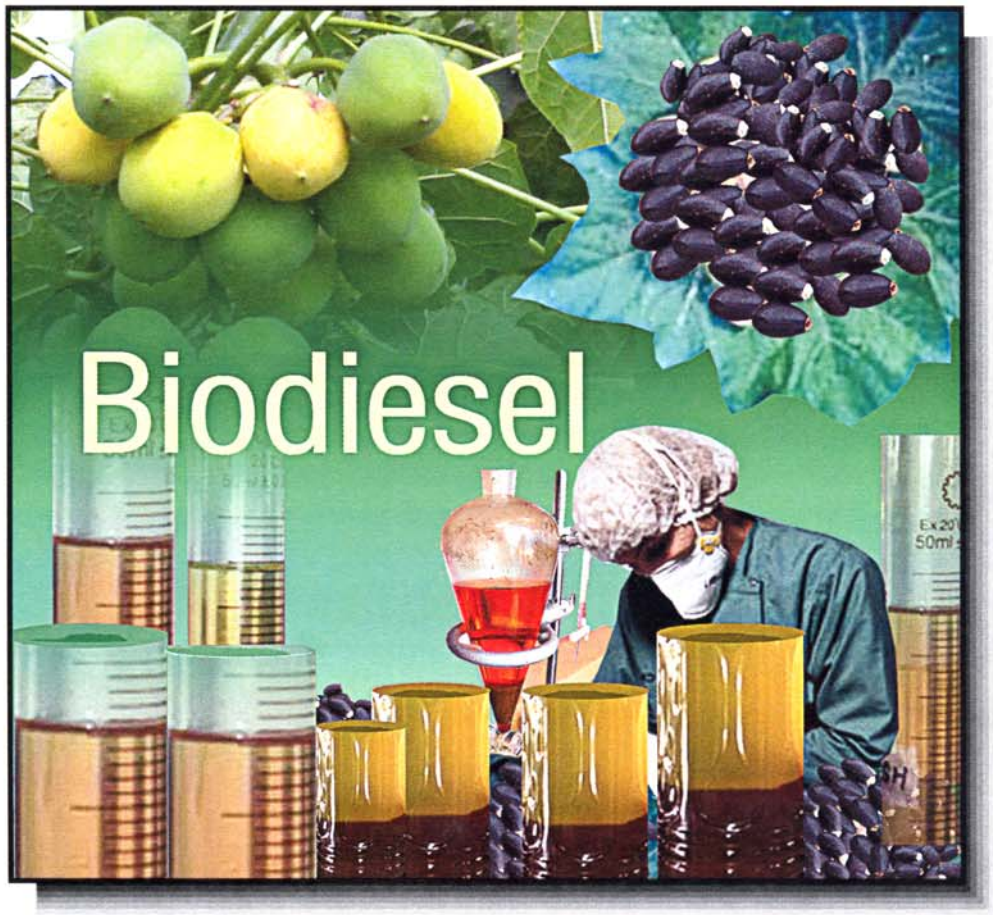
วว.

โครงการวิจัยที่ ภ. 50-07 / ย. 11 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การศึกษาความปลอดภัย ของผลิตภัณฑ์จากเมล็ดสบู่ดำ



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 50-07
การวิจัยและพัฒนาสบู่ดำเป็นเชื้อเพลิงทดแทนอย่างครบวงจร

โครงการย่อยที่ 11
การศึกษาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากเมล็ดสบู่ดำ

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
การศึกษาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากเมล็ดสบู่ดำ

โดย

ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล

เตือนตา เสมาทอง **ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา**

ยุทธนา ฐานมงคล **สรียา เรืองพัฒนพงศ์**

อมรรัตน์ ขยันการนาวี **ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร**

บรรณาธิการ วว., กรุงเทพฯ 2554

ลิขิต หาญจางสิทธิ์

บุญเรียม น้อยชุมแพ

พิสุทธิ์ พลับสวาท

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นางเกษมศรี หอมชื่น)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ในการสนับสนุนงบประมาณและสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้, รวมทั้งขอขอบคุณนางวัลลภา อรุณไพโรจน์ ผู้อำนวยการฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ที่ให้การสนับสนุน และคำปรึกษาในการดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี.

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวธนิตา สนธิเศวต นักวิชาการ ฝ่ายเทคโนโลยีทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม สำหรับการพัฒนาตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำในการศึกษาครั้งนี้.

ท้ายนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายวิเชียร เขยนอกและนางสาวปาจารีย์ นวมงาม ผู้ดูแลและเลี้ยงสัตว์ทดลองเพื่อสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	จ
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	6
3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	20
4. สรุปผลการทดลอง	45
5. ผลกระทบของโครงการ	47
6. ข้อเสนอแนะ	48
7. เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก	51

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.	คะแนนเฉลี่ยความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำ (n=3)	20
ตารางที่ 2.	ค่าเฉลี่ยคะแนนความผิดปกติต่อดวงตากระต่ายหลังหยอดตัวอย่างทดสอบ (n=3)	21
ตารางที่ 3.	อัตราการตายและผลการชันสูตรอวัยวะภายในจากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากตลอดการทดลองนาน 14 วัน ภายหลังได้รับผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำ	22
ตารางที่ 4.	อัตราการตายและผลการชันสูตรอวัยวะภายในจากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนังตลอดการทดลองนาน 14 วัน ภายหลังได้สัมผัสผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำ	24
ตารางที่ 5.	ผลอัตราการตายและอาการผิดปกติของหนูถีบจักรจากการสูดดมไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำจากกขบวนการที่ 1 และ 2	26
ตารางที่ 6.	อาการทางพิษวิทยาของหนูขาวทดลองภายหลังป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำจากกระบวนการที่ 1 และ 2	27
ตารางที่ 7.	ผลทางเคมีคลินิก (Blood chemistry) ของหนู Wistar เพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และ กระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน	31
ตารางที่ 8.	ผลทางเคมีคลินิก (Blood chemistry) ของหนู Wistar เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และ กระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน	32
ตารางที่ 9.	ผลทางโลหิตวิทยา (Hematology) ของหนู Wistar เพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และ กระบวนการที่ 2 (P2)เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน	33

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 10. ผลทางโลหิตวิทยา (Hematology) ของหนู Wistar เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และ กระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน 34

ตารางที่ 11. ผลทางเคมีคลินิกของปัสสาวะ (Urinalysis) หนู Wistar เพศผู้ในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และ กระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วัน และ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน 36

ตารางที่ 12. ผลทางเคมีคลินิกของปัสสาวะ(Urinalysis) หนู Wistar เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่1(P1)และ กระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและกลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน 37

ตารางที่ 13. น้ำหนักสัมพัทธ์อวัยวะภายในของหนู Wistar เพศผู้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1(P1) และ กระบวนการที่ 2(P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน 38

ตารางที่ 14. น้ำหนักสัมพัทธ์อวัยวะภายในของหนู Wistar เพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และกระบวนการที่ 2 เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน 39

ตารางที่ 15. ผลการประเมินความเป็นพิษต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศผู้หลังจากได้รับไบโอดีเซล น้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่1 และ 2 ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว นาน 24 ชั่วโมง เทียบกับ Cyclophosphamide 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (n = 5) 42

ตารางที่ 16. ผลการประเมินความเป็นพิษต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศเมียหลังจากได้รับไบโอดีเซล น้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่1 และ 2 ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว นาน 24 ชั่วโมง เทียบกับ Cyclophosphamide 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (n = 5) 42

ตารางที่ 17. ความเข้มข้นของไบโอดีเซลกระบวนการที่ 1 และ 2 ที่ 50 % ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ L 929 43

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1.	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวภายหลังจากการกินผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำ ระยะเวลา 8 และ 15 วัน	23
รูปที่ 2.	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวภายหลังจากการสัมผัสผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำทางผิวหนัง ระยะเวลา 8 และ 15 วัน	25
รูปที่ 3.	น้ำหนักหนูขาวในระยะเวลา 30 วัน และ 60 วันภายหลังได้รับไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการ 1 ของหนูเพศผู้	28
รูปที่ 4.	ลักษณะของเซลล์เมื่อได้รับไบโอดีเซล กระบวนการ ที่ 1 และ 2 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	44

SAFETY STUDIES OF JATROPHA SEED PRODUCTS

Chuleratana Banchonglikitkul, Parkpoom Siriarchavatana, Yoothana Thanmongkol, Tuanta Sematong, Sareeya Reunpathanaphong, Amonrat Khayungarnnawee and Sarunya Laovitthayanggoon

ABSTRACT

Jatropha curcas L. is a 3 to 4 meter tall shrub, which grows well in tropical climate areas including Thailand. Its seeds could be used as raw material for biodiesel production as renewal energy in the near future. Thus, the objective of this study is to evaluate the safety of Jatropha seed products such as glycerine, seed oil and biodiesel from two different process lines. The results of the products safety tests (OECD No. 420,404,402,405) showed that all Jatropha seed products revealed no skin and any eye irritation in rabits, no acute dermal and oral toxicity in rats (LD_{50} > 2,000 mg/kg b.w.). The biodiesels from two different process lines dose at 2,000 mg/kg b.w. exhibited no inhalation toxic in mice (1.5 ppm/0.34 m^3) and no severe pathological and functional effects on lung, liver, kidney, heart, brain, ovary and testis in rats after longterm taken (30 days). The acute mutagenic study of those biodiesels at dose of 2,000 mg/kg b.w. in rats' bone marrow using chromosome aberration method (OECD No. 475) was investigated. Results showed that normal chromosome and significance ($p < 0.05$) mitotic index reduction were found. Moreover, those biodiesels exhibited the 50 % cytotoxic effect to mouse fibroblast cell line (L929) at the concentration of 17.09 % v/v and 16.36 % v/v.

การศึกษาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากเมล็ดสบู่ดำ

ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล[1], ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา[1], ยุทธนา ฐานมงคล[2], เตือนตา เสมาทอง[1], สรียา เรืองพัฒนพงศ์[1], อมรรัตน์ ขยันการนาวี[1] และ ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูล[1]

บทคัดย่อ

ต้นสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) จัดเป็นไม้พุ่มที่มีความสูง 3-4 เมตร, เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนรวมทั้งในประเทศไทย. เมล็ดสบู่ดำสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงเพื่อเป็นพลังงานทดแทนในอนาคต. การศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความปลอดภัยผลิตภัณฑ์จากเมล็ดสบู่ดำได้แก่ กลีเซอรีน, น้ำมันสบู่ดำ, ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ, จากกระบวนการผลิตที่ทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นสมบูรณ์ และจากกระบวนการผลิตที่ไม่ผ่านกระบวนทำให้บริสุทธิ์. ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ผลิตภัณฑ์ทั้ง 5 ชนิดผ่านการทดสอบความปลอดภัยตามมาตรฐาน OECD (หมายเลข 420, 404, 402, 405) โดยไม่มีผลก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย, มีผลระคายเคืองต่อเยื่อบุตาเล็กน้อย, มีค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LD_{50}) จากการกินและสัมผัสทางผิวหนัง มากกว่า 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวในหนูขาวทั้งสองเพศ และไม่พบความเป็นพิษจากการสูดดม (มอก.309 – 2525) ของไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำขนาดความเข้มข้น 1.5 ส่วนต่อล้านส่วน/พื้นที่ 0.34 ลูกบาศก์เมตร (1.5 มิลลิกรัม/ลิตร) ในหนูถีบจักร. ส่วนผลการทดสอบความเป็นพิษของการป้อนไบโอดีเซลทั้งสองกระบวนการ ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวให้หนูขาวทั้งสองเพศวันละครั้ง ต่อเนื่องนาน 30 วัน, พบว่า ไม่มีผลพยาธิสภาพรุนแรงต่อเนื้อเยื่ออวัยวะภายใน เช่น ปอด, ตับ, ไต, หัวใจ, สมอง, รังไข่ และอัณฑะ, ไม่มีผลต่อระบบการทำงานของตับและไต. สำหรับการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของไบโอดีเซลจากทั้ง 2 กระบวนการขนาดความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ต่อการทำลายโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกหนูขาว (OECD หมายเลข 475), พบว่า มีผลทำให้ mitotic index ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) แต่โครโมโซมปกติ. นอกจากนี้ ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหนู (L929) ด้วยวิธี MTT assay ของไบโอดีเซลล์สบู่ดำ, พบว่า ไบโอดีเซลทั้ง กระบวนการ 1 และ 2 มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 17.09 %v/v และ 16.36 %v/v, ตามลำดับ.

---

[1]ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

[2]ฝ่ายเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและทรัพยากร, วว.

1. บทนำ

ปัจจุบันสบู่ดำเป็นพืชน้ำมันที่มีการปลูกในประเทศ สบู่ดำเป็นไม้พุ่มลำต้นสูง 3-4 เมตร, มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae, เป็นพืชมหัศจรรย์ที่เติบโตได้ดีในภูมิอากาศเขตร้อนชื้นของโลก (tropical climate), สามารถดำรงอยู่ได้ในทุกสภาวะ แม้ต้องเผชิญกับภาวะแห้งแล้งอย่างต่อเนื่อง 2-3 ปีก็ตาม (Gubitz *et. al.,* 1999). เมล็ดสบู่ดำสามารถนำไปสกัดน้ำมันได้ภายหลังการปลูกปีที่สอง, เมล็ดสีดำสนิทจะมีไขมันเป็นองค์ประกอบมากถึงร้อยละ 53, โปรตีนร้อยละ 26 (Makkar *et. al.* 1997) และมีรสชาติดี (Kandpal *et. al.* 1995) ทำให้เข้าใจผิดว่าสามารถรับประทานได้, แต่ยังไม่มีสถิติของพื้นที่เพาะปลูกและข้อมูลความปลอดภัยของน้ำมันและผลผลิตสบู่ดำที่เหลือทิ้งจากสบู่ดำอย่างชัดเจน. ข้อมูลความปลอดภัยที่มีอยู่จะเป็นข้อมูลที่ได้จากประเทศแถบเมืองร้อน เช่น แอฟริกาตะวันตกมีการใช้ส่วนราก, ใบ, ต้น, เมล็ด และผลสบู่ดำเป็นยาแผนโบราณกันอย่างกว้างขวาง. โดยส่วนของเมล็ดใช้สำหรับขับพยาธิ, เป็นยาถ่าย, เป็นยาสำหรับการทำแท้ง. นอกจากนี้ ยังสำหรับใช้รักษาโรคตับแข็ง, โรคเกาต์, อัมพฤกษ์ และโรคผิวหนัง. ส่วนน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำใช้เป็นส่วนผสมรักษาอาการของโรครูมาติซึม, อาการคันของผิวหนัง, รักษาไข้, ดีซ่าน, โกโนเรีย, ใช้เป็นสารขับปัสสาวะ และน้ำยาบ้วนปาก. ส่วนของใบสบู่ดำมีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารห้ามเลือด, ส่วนของเปลือกใช้เป็นยาพิษสำหรับปลา, ชาวแอฟริกันยังนิยมนำเมล็ดสบู่ดำมาเคี้ยวเป็นยาถ่าย. จึงสรุปได้ว่า เมล็ดสบู่ดำมีศักยภาพที่สามารถนำมาใช้เป็นยาโดยไม่มีพิษ (Adam 1974). ผลจากการรวบรวมความเป็นพิษของสบู่ดำมีดังนี้.

ผลการศึกษาพิษของสบู่ดำ

จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่า ทุกส่วนของต้นสบู่ดำมักมีความเป็นพิษโดยเฉพาะเมล็ด (Makkar and Becker 2009). มีรายงานการเกิดพิษจากการกินเมล็ดสบู่ดำของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่เลี้ยงแบบปล่อยทุ่งในช่วงฤดูแล้งที่อาหารขาดแคลน. ลูกโคที่กินเมล็ดสบู่ดำในขนาด 0.25-1 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวอาจตายภายในเวลา 19 ชั่วโมง. ขณะที่แพะและแกะที่กินเมล็ดสบู่ดำในปริมาณ 0.05, 0.5 และ 1 กรัม/กก./วันจะมีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพดังนี้, ทำให้เลือดออกในกระเพาะอาหารส่วน rumen และ reticulum, ปอด, ไต และหัวใจ, ไขมันในตับเปลี่ยนแปลง. นอกจากนี้ ยังพบความเข้มข้นของเอ็นไซม์ตับ (AST หรือ GOT), โพแทสเซียมและโซเดียมเพิ่มขึ้น ขณะที่โปรตีนและแคลเซียมในซีรัมลดลงเท่ากัน, จะตายในช่วงระยะเวลา 7-21 วัน (Ahmed and Adam 1979). นอกจากนี้ ยังพบความเป็นพิษที่เกิดขึ้นในเด็กที่กินเมล็ดสบู่ดำด้วยความบังเอิญเพียง 2-3 เมล็ดเท่านั้น. แสดงให้เห็นว่า ความเป็นพิษของเมล็ดสบู่ดำจะมีผลแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด. พิษ

ส่วนใหญ่จะแสดงอาการในระบบทางเดินอาหาร เช่น ปวดท้องอย่างเฉียบพลัน, อาเจียน, ถ่ายเหลว. ในรายที่รุนแรงอาจเกิดเลือดออกในภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (hemorrhagic gastroenteritis) ขึ้น, มีผลทำให้ผู้ป่วยอุจจาระเป็นเลือด, รวมทั้งขาดน้ำอย่างรวดเร็ว. บางรายงานได้แจ้งถึงลักษณะกลุ่มอาการทางระบบประสาทด้วย เช่น กล้ามเนื้อหดเกร็ง, น้ำลายไหล, และบางรายงานได้กล่าวถึงกลุ่มอาการคล้ายการออกฤทธิ์ของอาโทรปีน เช่น เหงื่อออก, ปากแห้ง, ม่านตาขยาย และหัวใจเต้นเร็ว, ซึ่งจะแสดงออกภายหลังการกินเมล็ดสบู่ดำเป็นเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง (Aplin 1976). การศึกษาความเป็นพิษของเมล็ดสบู่ดำในหนูถีบจักร โดยผสมอาหารในสัดส่วนร้อยละ 40-50, สามารถทำให้หนูตายโดยแสดงอาการซึม, ถ่ายเหลว, การทรงตัวผิดปกติ. เมื่อตรวจผ่าซาก จะพบความเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของลำไส้เล็กอักเสบ, ชั้นเยื่อเมือกของลำไส้ถูกทำลาย มีการหลุดลอก เลือดออกและเกิดเลือดคั่ง, รวมทั้งหัวใจ, ปอด, ตับ, และไต, เกิดลักษณะการสะสมของไขมันแบบผิดปกติ (Adam 1974). สารพิษหลักที่พบในเมล็ดสบู่ดำ ได้แก่ Curcin (toxalbumin) และ purgative oil ที่ประกอบด้วยสารระคายเคือง curcanoleic acid จำนวนเล็กน้อย (Joubert *et al,* 1984). ส่วนพิษอื่นๆ ที่พบในสบู่ดำ ได้แก่ hydrocyanic acid. บางครั้งอาจพบเรซินที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนัง, หรือบางครั้งอาจพบสาร alkaloid และ glycoside ที่ออกฤทธิ์กดการหายใจ. ส่วนผลจากการศึกษาความปืนพิษของสารสกัดเมล็ดสบู่ดำจากประเทศเม็กซิโกด้วยน้ำ, เมทานอล และเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 2 : 1, โดยการฉีดให้หนูถีบจักรและให้สารสกัดในอวัยวะแยกส่วนของหัวใจห้องบน (isolated atrium) ของหนูตะเภา, พบว่า สารสกัดสบู่ดำด้วยเมทานอลต่อน้ำมีพิษต่อหนูถีบจักรอย่างมีนัยสำคัญ. ส่วนของน้ำมันสบู่ดำจากเมล็ดดิบนำมาผสมในอาหารและน้ำมันข้าวโพด (0:1, 1:4, 1:1) ทำให้มีไขมันประมาณร้อยละ 15, จากนั้น ให้หนูขาวกินจะไม่พบพิษแต่อย่างใด (Panigrahi *et al.* 1984). อย่างไรก็ตาม ความเป็นพิษทั้งหมดนั้นอาจเกิดขึ้นจากส่วนต่างๆ ของพืช, กากเมล็ดที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน, น้ำมันเมล็ดสบู่ดำ หรือพื้นที่ในการปลูก.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยฝ่ายเทคโนโลยีทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมได้ดำเนินการวิจัยชุดโครงการ การวิจัยและพัฒนาสบู่ดำเป็นเชื้อเพลิงทดแทนอย่างครบวงจร, โดยมีฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติดำเนินการศึกษาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เมล็ดสบู่ดำ (โครงการย่อยที่ 11), ซึ่งผลิตภัณฑ์เมล็ดสบู่ดำที่ได้รับจากฝ่ายเทคโนโลยีทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมเพื่อการศึกษาความปลอดภัยในครั้งนี้ ได้แก่:

1. กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2.
2. ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1.
3. ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2.

4. น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 (สุพรรณบุรี).

5. น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2 (รอบๆ บริเวณ สระน้ำพระราม 9 ปทุมธานี).

การสกัดน้ำมันสบู่ดำจากแหล่งที่ 1 (จังหวัดสุพรรณบุรี) และนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลด้วยกระบวนการ ดังนี้:

1. กระบวนการที่ 1 ได้แก่ กระบวนการที่ทำปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลแบบเสร็จสิ้นสมบูรณ์ สามารถนำไปใช้ได้.

2. กระบวนการที่ 2 ได้แก่กระบวนการที่ทำปฏิกิริยาและทำการแยกชั้น โดยยังไม่ผ่านกระบวนทำให้บริสุทธิ์.

วัตถุประสงค์ของการศึกษาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากน้ำมันสบู่ดำ ทั้ง 5 ตัวอย่างในครั้งนี้ เพื่อนำข้อมูลความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำไปใช้ประกอบ, สนันสนุน หรือต่อยอดในอุตสาหกรรมพลังงานทดแทนหรืออุตสาหกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ

- ตัวอย่างทดสอบ : ได้รับจากฝ่ายพลังงานและสิ่งแวดล้อม 5 ตัวอย่างดังนี้:
  1. กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2.
  2. ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1.
  3. ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2.
  4. น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1.
  5. น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2.
- สัตว์ทดลอง : กระต่ายสีขาวพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ลูกผสมทั้งสองเพศ จากภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, น้ำหนักตัวประมาณ 2.0 – 3.0 กิโลกรัม จำนวน 18 ตัว.
- สัตว์ทดลอง : หนูขาวพันธุ์ Wistar ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม, ประกอบด้วยหนูเพศผู้ 60 ตัว และเพศเมีย 60 ตัว, น้ำหนักตัวหนูเพศผู้อยู่ระหว่าง 204 - 250 กรัม และหนูเพศเมียอยู่ระหว่าง 171 – 209 กรัม.
- สัตว์ทดลอง : หนูถีบจักร สีขาวพันธุ์ IRC น้ำหนักตัวประมาณ 20 - 30 กรัม, เพศผู้จำนวน 20 ตัว, จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม.
- สัตว์ทดลอง : หนูขาวพันธุ์ Wistar อายุ 5-7 สัปดาห์ เพศผู้และเพศเมีย เพศละ 120 ตัว, จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม.
- เซลล์เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหนูถีบจักร (CRL-CCL-1 cell line), Mouse fibroblast, ATCC, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- อาหารสัตว์ทดลอง บริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย.
- น้ำดื่ม ใช้น้ำกรอง.
- Patch หมายถึง ผ้าพันแผลมาตรฐานขนาด 2.5 เซนติเมตร × 2.5 เซนติเมตร ทบซ้อนกัน 10 ชั้น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีนึ่งอบโดยใช้แรงดันไอน้ำ.
- พลาสเตอร์ Leukoplast porous BDF Intanin Co., Ltd., ประเทศไทย.
- Transpore™ บริษัท สามเอ็ม ประเทศไทย จำกัด.
- ผ้ายืด Pack and Grand, CCN Co., Ltd., ประเทศไทย.
- สำลี, น้ำกลั่น, แอลกอฮอล์.

- กระบอกฉีดยาขนาด 1, 3, 5 และ 10 มิลลิลิตร ; nippe , Nissho Nipper Corporation Ltd., ประเทศไทย.
- การวิเคราะห์ค่าเคมีคลินิกในเลือดส่งตรวจที่ กรุงเทพ อาร์ ไอ เอ แล็บ, ประเทศไทย.
- ฟอร์มาลิน 40%, ประเทศไทย.
- Na_2HPO_4 ,Merck, ประเทศเยอรมนี.
- $NaH_2PO_4.H_2O$,Merck, ประเทศเยอรมนี.
- Colchicine, Sigma-Aldrich Co., ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Cyclophosphamide (CP), Sigma-Aldrich Co., ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Glacial acetic acid, Merck, ประเทศเยอรมนี.
- Potassium chloride, Merck, ประเทศเยอรมนี.
- Potassium dihydrogen phosphate, Merck, ประเทศเยอรมนี.
- Sodium dihydrogen phosphate dehydrate, Merck, ประเทศเยอรมนี.
- Giemsa's stain, GIBCO®, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Methyl alcohol anhydrous, Merck, ประเทศเยอรมนี.
- Xylene, Merck, ประเทศเยอรมนี.
- Hank's Balanced Salt solution (without $NaHCO_3$), Sigma-Aldrich Co., ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Glycerine, Merck, ประเทศเยอรมนี.
- Permount, Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Minimum essential media, GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Horse serum, GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Phosphate buffer solution(PBS), GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Penicillin/Streptomycin, GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- 0.05% Trypsin-versene (Trypsin/EDTA) , GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Tryphan blue 0.4%, GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, (MTT), GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Dimethyl sulfoxide (DMSO), Sigma Chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- 96-well plate, Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- Slide และ cover slip.

2.2 อุปกรณ์

- Autoclave, รุ่น SS-320, Tomy Limited, ประเทศญี่ปุ่น.
- ปัตตาเลี่ยนไฟฟ้า Wahl Clipper Corp., Stering, Illinois, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- เครื่องชั่ง OHAUS รุ่น E 02140, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์.
- ตู้กระจกขนาด 700 มิลลิเมตร × 700 มิลลิเมตร × 700 มิลลิเมตร พร้อมนาฬิกาจับเวลาและปั๊มดูดควันเข้าตู้ ผลิตโดยบริษัท พรรณีเอ็นจิเนียริ่ง, ประเทศไทย.
- เครื่องชั่งสัตว์ทดลอง Mettler Toledo รุ่น PG-S, สวิตเซอร์แลนด์.
- Microplate reader, GENios Plus, TECAN, ประเทศออสเตรีย.
- เครื่อง CO_2 Incubator, SHEL LAB Co. Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- เครื่อง Neubolizer, Flaem Nuova S.p.A, ประเทศอิตาลี.
- กรงเก็บปัสสาวะ (metabolic cages), ผลิตในประเทศไทย.
- Autoclave, Sturdy, ไต้หวัน, ประเทศจีน.
- BECKMAN Microfuge™11, Beckman, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
- เครื่อง Urilux® S, Roche Diagnostics GmbH, ประเทศเยอรมนี.
- กรรไกรผ่าตัด.
- หลอดป้อนเหล็กกล้าไม่เป็นสนิม.

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 วิธีการทดสอบการก่อความระคายเคืองผิวหนังกระต่าย

ดำเนินการทดสอบผลิตภัณฑ์จากน้ำมันสบู่ดำ ตามวิธีการทดสอบหมายเลข 404 : การทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2002), มีรายละเอียดดังนี้.

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

นำกระต่าย 3 ตัว (ต่อ 1 ตัวอย่างทดสอบ) มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนทำการทดสอบ 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสถานที่, โดยกระต่ายจะได้รับน้ำและอาหารตามปกติ. ก่อนทำการทดสอบ 1 วัน, กระต่ายทุกตัวจะถูกโกนขนบริเวณลำตัวใต้หัวไหล่ชิดกระดูกสันหลังทั้งสองข้างเป็นบริเวณ 10×10 เซนติเมตร ด้วยปัตตาเลี่ยนไฟฟ้า ให้ขนสั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้, แต่ไม่ให้ผิวหนังเป็นแผล.

การเตรียมตัวอย่าง

- กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1 ความเข้มข้น 100 %.
- ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.

วิธีการ

ในวันทดลอบ, ชั่งน้ำหนักหนู, จัดแบ่งหนูเป็น 6 กลุ่มด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย, แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนู 10 ตัว คือ เพศผู้และเพศเมีย, เพศละ 5 ตัว ดังนี้.

กลุ่มที่ 1 กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2.

กลุ่มที่ 2 ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1.

กลุ่มที่ 3 ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2.

กลุ่มที่ 4 น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1.

กลุ่มที่ 5 น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2.

กลุ่มที่ 6 น้ำกลั่น.

จากนั้น ดูดตัวอย่างทดสอบ 100% ของตัวอย่างแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบน patch และนำมาปิดลงบนผิวหนังกระต่ายด้านหนึ่งที่โกนขนเตรียมไว้ (บริเวณทดสอบ). ส่วนอีกด้านหนึ่งของกระต่ายตัวเดิมปิดด้วย patch ที่เกลี่ยด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (บริเวณควบคุม). ยึด patch ด้วยพลาสเตอร์ชนิด Transpore และห่อลำตัวกระต่ายด้วยผ้ายืด, เพื่อยึด patch ติดกับผิวหนังไม่ให้เคลื่อนหลุด. เมื่อครบ 4 ชั่วโมง, เปิด patch ออก แล้วใช้สำลีชุบน้ำอุ่นเช็ดเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างทดสอบที่เหลือค้างอยู่บนผิวหนังหลุดออก. ตรวจดูอาการแดงและอาการบวมตรงบริเวณทดสอบ ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง. ถ้าพบว่า ยังมีอาการแดงและอาการบวมอยู่ ให้ตรวจดูอาการต่อจนถึงวันที่ 14. การให้คะแนนยึดตามหลักเกณฑ์ดังนี้:

หลักเกณฑ์การให้คะแนน

อาการแดง	**คะแนน**
ไม่แดง	0
แดงเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้	1
แดงจนมองเห็นได้ชัด	2
แดงปานกลางถึงแดงมาก	3

แดงช้ำถึงผิวหนังตกสะเก็ด	4
อาการบวม	**คะแนน**
ไม่บวม	0
บวมเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้	1
บวมน้อย (ขอบนูนเห็นได้ชัดเจน)	2
บวมปานกลาง (นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร)	3
บวมมาก (นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร และลามออกไป)	4

2.3.2 วิธีการทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อดวงตากระต่าย

ดำเนินการทดสอบผลิตภัณฑ์จากน้ำมันสบู่ดำ ตามวิธีการทดสอบหมายเลข 405 : Acute Eye Irritation / Corrosion ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2002), มีรายละเอียดดังนี้:

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

นำกระต่าย 3 ตัว (ต่อ 1 ตัวอย่างทดสอบ) มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนทำการทดสอบ 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสถานที่, โดยกระต่ายจะได้รับน้ำและอาหารตามปกติ.

<u>การเตรียมตัวอย่าง</u>

- กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1 ความเข้มข้น 100 %.
- ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำกลั่น.

<u>วิธีการ</u>

ก่อนทำการทดสอบ 1 วัน, ตรวจสอบความผิดปกติของดวงตากระต่าย โดยหยดสารละลาย 2% fluorescein sodium ophthalmic solution (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงในดวงตาทั้ง 2 ข้างๆ ละ 25 ไมโครลิตร. หลังจากนั้นประมาณ 1 นาที, ล้างดวงตาทั้ง 2 ข้าง ด้วยสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ น้ำหนัก/ปริมาตร) อย่างเบามือและตรวจดูดวงตากระต่ายด้วยตาเปล่าโดยใช้ไฟฉาย. หากพบว่า ดวงตาใดมีการติดสีของ fluorescein ซึ่งจะเห็นเป็นปื้นสีเขียวบนกระจกตา (cornea) หรือเยื่อบุนัยน์ตา (conjunctiva) กระต่ายตัวนั้นจะไม่นำมาใช้ทำการทดสอบ.

วันทดสอบ ให้หยอดสารทดสอบลงในตาที่เลือกไว้ โดยค่อยๆ ดึงเปลือกตาล่างออกอย่างเบามือ. จากนั้น จึงหยอดตัวอย่างทดสอบ ปริมาตรตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร, ปิดเปลือกตาทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที. ให้คะแนนปฏิกิริยาต่างๆ ของดวงตาที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากหยอดตัวอย่างทดสอบ. ถ้าดวงตาของกระต่ายยังไม่หายเป็นปกติ ให้สังเกตอาการต่อทุกวัน แต่ไม่เกิน 21 วัน, การให้คะแนนยึดตามหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้.

หลักเกณฑ์ในการให้คะแนน

กระจกตา (cornea)

A ระดับของความขุ่น (degree of density) (วัดจากบริเวณที่มีความขุ่นมากที่สุด)

0	=	กระจกตาปกติ
1	=	มีความขุ่นเล็กน้อยกระจายเบาบางบนกระจกตา แต่ยังเห็นรายละเอียดของม่านตาชัดเจน
2	=	มองเห็นบริเวณที่ขุ่นได้ง่าย และรายละเอียดของม่านตามัวเล็กน้อย
3	=	บริเวณขุ่นไม่เห็นรายละเอียดของม่านตา มองเห็นขนาดของรูม่านตาได้ยาก
4	=	ขุ่นมาก และมองไม่เห็นม่านตา

ม่านตา (iris)

0	=	ม่านตาปกติ
1	=	ม่านตาเป็นคลื่นลึกกว่าระดับปกติ มีเลือดคั่ง บวม มีเลือดคั่งมากบริเวณรอบๆ กระจกตา (อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งหมด)
2	=	ไม่ตอบสนองต่อแสง มีเลือดออก มีการทำลายทั้งหมด (มีอาการอย่างใดอย่างหนึ่งหรือ ทั้งหมด)

เยื่อบุลูกตา, เยื่อตาขาว (conjunctivae)

A อาการแดง (erythema) รวมถึงเยื่อบุเปลือกตา ผนังตา เยื่อบุกระบอกตาแต่ไม่รวมกระจกตา และม่านตา

0	=	เส้นเลือดปกติ
1	=	มีเลือดคั่งเล็กน้อยที่เยื่อบุหนังตาบนและหนังตาล่าง เปลือกตา และเยื่อหุ้มลูกตา (nictitating membrane)
2	=	มีเลือดคั่งเป็นบริเวณกว้าง เยื่อตาสีแดงเข้ม แยกแยะเส้นเลือดแต่ละเส้นได้ยาก
3	=	เยื่อตาสีแดงคล้ำออกน้ำตาล

B อาการบวม (oedema)

0	=	ไม่บวม
1	=	มีอาการบวมเล็กน้อยที่เยื่อบุลูกตา และเยื่อหุ้มลูกตา
2	=	บวมชัดเจนและเปลือกตากลับบางส่วน และ/หรือเปลือกตาปิดประมาณครึ่งหนึ่ง
3	=	บวมและเปลือกตาปิดครึ่งหนึ่งจนถึงปิดประมาณ 3 ใน 4
4	=	บวมและเปลือกตาปิด 3 ใน 4 จนถึงปิดหมด

2.3.3 วิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันจากการกินผลิตภัณฑ์จากน้ำมันสบู่ดำ ตามวิธี : Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Method (Limit test); หมายเลข 420 ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2001), มีรายละเอียดดังนี้.

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

ก่อนทำการทดสอบ นำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส. จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายและทำสัญลักษณ์ประจำตัว โดยการแต้มเบอร์ที่หาง. งดให้อาหารหนู 16 ชั่วโมงก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ.

<u>การเตรียมสารทดสอบ</u>

- กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1 ความเข้มข้น 100 %.
- ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำกลั่น.

<u>วิธีการ</u>

ในวันทดสอบ, ชั่งน้ำหนักหนู, จัดแบ่งหนูเป็น 6 กลุ่มด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย, แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนู 10 ตัว คือเพศผู้และเพศเมีย, เพศละ 5 ตัว ดังนี้.

กลุ่มที่ 1 กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2.

กลุ่มที่ 2 ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1.
กลุ่มที่ 3 ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2.
กลุ่มที่ 4 น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1.
กลุ่มที่ 5 น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2.
กลุ่มที่ 6 น้ำกลั่น.

ป้อนหนูด้วยสารละลายผลิตภัณฑ์จากน้ำมันสบู่ดำในแต่ละกลุ่ม ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว. ส่วนหนูในกลุ่มควบคุมให้ป้อนน้ำกลั่น ปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดลอง. ภายหลังป้อนตัวอย่างทดสอบครบ 4 ชั่วโมง, ให้อาหารแก่หนูทุกกลุ่มตามปกติ, สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูหลังป้อนตัวอย่างทดสอบที่เวลา 1/2, 1 และ 3 ชั่วโมง. จากนั้น สังเกตอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน. ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวในวันที่ 1, 8 และ 15 (วันสิ้นสุดการทดลอง). หนูที่แสดงอาการผิดปกติอย่างรุนแรง หรือหนูที่มีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดลองครบ 14 วัน, จะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบโดยการให้สูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อตรวจสอบดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน (gross pathology). เปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ทางสถิติโดยใช้วิธี Student's t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, เพื่อศึกษาผลของตัวอย่างทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนู.

2.3.4 วิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันจากการกินผลิตภัณฑ์จากน้ำมันสบู่ดำ ตามวิธี : Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Method (Limit test); หมายเลข 420 ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2001), มีรายละเอียดดังนี้.

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

ก่อนทำการทดสอบ นำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส. จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายและทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง. งดให้อาหารหนู 16 ชั่วโมงก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ.

<u>การเตรียมสารทดสอบ</u>

- กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1 ความเข้มข้น 100 %.

- ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- น้ำกลั่น.

<u>วิธีการ</u>

ก่อนการทดสอบ 1 วัน โกนขนหนูบริเวณสันหลังเหนือสะโพกเป็นบริเวณกว้าง 5×5 เซนติเมตร โดยไม่ให้มีรอยถลอกบนผิวหนัง. ในวันทดสอบ ชั่งน้ำหนักหนูทุกตัว, จัดแบ่งหนูเป็น 6 กลุ่มด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนู 10 ตัว คือเพศผู้และเพศเมีย, เพศละ 5 ตัว, ดังนี้.

กลุ่มที่ 1 กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2.
กลุ่มที่ 2 ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1.
กลุ่มที่ 3 ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2.
กลุ่มที่ 4 น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1.
กลุ่มที่ 5 น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2.
กลุ่มที่ 6 น้ำกลั่น.

โดยนำตัวอย่างในกลุ่มทดสอบที่ 1-5 ขนาดตัวอย่างทดสอบละ 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เกลี่ยลงบน patch และปิด patch ลงบนผิวหนังบริเวณที่โกนขนออกของหนูแต่ละกลุ่ม. ในขณะกลุ่มควบคุม ให้เกลี่ยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดสอบเกลี่ยลงบน patch. จากนั้น ยึด patch ด้วยพลาสเตอร์ชนิด Transpore และห่อลำตัวด้วยผ้ายืด เพื่อยึด patch ติดกับผิวหนังไม่ให้เคลื่อนหลุด. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำ patch ออก, ใช้สำลีปลอดเชื้อชุบน้ำอุ่นเช็ดตัวอย่างทดสอบที่เหลือค้างอยู่บนผิวหนังออก. สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูที่เวลา ½, 1 และ 3 ชั่วโมง หลังให้ตัวอย่างทดสอบและอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน. ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวในวันที่ 1, 8 และ 15 (วันสิ้นสุดการทดสอบ).

หนูที่แสดงอาการผิดปกติอย่างรุนแรงหรือหนูที่มีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดลองครบ 14 วัน จะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบโดยการให้สูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อตรวจสอบดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน (gross pathology). เปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ทางสถิติโดยใช้วิธี Student's t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, เพื่อศึกษาผลของตัวอย่างทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนู.

2.3.5 วิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันจากการสูดดม

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันจากการสูดดมผลิตภัณฑ์จากน้ำมันสบู่ดำ ดัดแปลงตามวิธีมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 309 – 2525, โดยมีรายละเอียดดังนี้.

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

ก่อนทำการทดสอบ นำหนูถีบจักรมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส, โดยให้อาหารและน้ำดื่มตามปกติ.

<u>การเตรียมสารทดสอบ</u>

- ชั่งไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1, ปริมาตร 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นขนาด 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร.
- ชั่งไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่1 กระบวนการที่ 2, ปริมาตร 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรให้มีความเข้มข้นขนาด 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร.

<u>วิธีการ</u>

วันทดสอบ ชั่งน้ำหนักหนูถีบจักรทดลอง, จากนั้น นำหนูทดลองทั้ง 10 ตัวต่อ 1 ตัวอย่าง เข้าตู้กระจก, เปิดเครื่องปั๊มดูดควันเข้าตู้กระจกระบบปิดขนาด 700×700×700 มิลลิเมตร พร้อมกับฉีดพ่นตัวอย่างทดสอบด้วยเครื่องฉีดพ่น (atomizer) โดยมีความเข้มข้นตัวอย่างทดสอบ 1.55 ppm/0.34 m^3. จากนั้น ทิ้งให้หนูทดลองสูดดมตัวอย่างทดสอบเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง, เมื่อครบกำหนดสังเกตอาการผิดปกติของหนูทดลองที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.

<u>การประเมินผล</u>

ถ้าพบว่าหนูถีบจักรตายภายในเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 1 ตัว หรือมากกว่า, ให้ถือว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นพิษเฉียบพลันทางการสูดดม.

2.3.6 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่ออัวยวะภายในสัตว์ทดลอง

การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันหรือความเป็นพิษต่ออวัยวะภายในของไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำกระบวนการ1 และ 2, ตามวิธี Repeated Dose 30-Day Oral Toxicity Study in Rodent of OECD Guideline for the Testing of Chemical (1998), โดยมีรายละเอียดดังนี้.

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ก่อนทำการทดสอบ นำหนูขาวเพศผู้และเมีย จำนวนเพศละ 100 ตัว มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส, โดยให้อาหารและน้ำดื่มตามปกติ.

การเตรียมสารทดสอบ

- ชั่งไบโอดีเซล กระบวนการที่ 1, ปริมาตร 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นขนาด 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร.
- ชั่งไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2, ปริมาตร 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรให้มีความเข้มข้นขนาด 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร.

วิธีการ

ก่อนวันทดสอบ 1 วัน งดให้อาหารหนูขาวทุกตัวนาน 16 ชั่วโมง โดยให้น้ำดื่มตามปกติ. วันทดสอบ ชั่งน้ำหนักตัวหนูและทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง, จัดแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มต่อตัวอย่าง แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูเพศผู้และเพศเมีย เพศละ 10 ตัว, ดังนี้.

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control) ป้อนน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากลุ่มทดลอง ต่อเนื่องนาน 30 วัน.

กลุ่มที่ 2 ป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ (BD) 1 หรือ 2 ขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ต่อเนื่องนาน 30 วัน.

กลุ่มที่ 3 ป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ (BD) 1 หรือ 2 ขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ต่อเนื่องนาน 30 วัน.

กลุ่มที่ 4 ป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ (BD) 1 หรือ 2 ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ต่อเนื่องนาน 30 วัน.

กลุ่มที่ 5 กลุ่ม Satellite ป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ (BD) 1 หรือ 2 ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม น้ำหนักตัว ต่อเนื่องนาน 30 วัน หยุดป้อนและสังเกตอาการต่ออีก 60 วัน.

ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ หนูทุกกลุ่มจะถูกเก็บปัสสาวะเพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical urine analysis), เก็บเลือดจากเส้นเลือดดำที่หาง เพื่อศึกษาทางโลหิตวิทยาและศึกษาทางด้านเคมีคลินิก. หลังป้อนตัวอย่างทดสอบ ทำการสังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูอย่างน้อยวันละครั้ง ทุกวันติดต่อกันนาน 30 วัน และชั่งน้ำหนักตัวหนูทุกๆ 7 วัน จนครบ 30 วัน และ 60 วัน สำหรับกลุ่ม Satellite.

ก่อนวันสิ้นสุดการทดลอง (30 วัน และ 60 วัน) 1 วัน, สุ่มตัวอย่างหนูที่มีชีวิตรอด จำนวน 6 ตัวต่อกลุ่ม เพศและ 3 ตัว. งดให้อาหารหนูนาน 16 ชั่วโมงโดยให้น้ำดื่มตามปกติ. ทำการเก็บปัสสาวะเพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical urine analysis). เก็บเลือดจากเส้นเลือดดำที่หางเพื่อศึกษาทางโลหิตวิทยา. หลังจากนั้น ให้หนูทดลองดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์. เปิดหน้าท้อง และเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำใหญ่ในช่องท้อง (abdominal vein), นำมาปั่นแยกเอาซีรัม เพื่อศึกษาทางด้านเคมีคลินิก, ได้แก่ วิเคราะห์ Alanine Transminase(ALT), Aspartate Transaminase(AST), Creatinine และ Urea Nitrogen. หลังจากเก็บตัวอย่างเลือด ตรวจดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน (gross pathological examination). เก็บอวัยวะภายใน ได้แก่ สมอง, ปอด, หัวใจ, ตับ, ไต, อัณฑะ, รังไข่ และมดลูก. ชั่งน้ำหนักอวัยวะภายในแล้วเก็บใน buffered formalin เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยย้อมสี hematoxylin และ eosin, แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์.

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

เปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูและอัตราการกินอาหารระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์ข้อทางสถิติด้วยวิธี One-Way *ANOVA* และ Kruskal-Wallis test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

2.3.7 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อโครโมโซมสัตว์ทดลอง

การทดสอบผลของ “ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1 และกระบวนการที่2” ต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว ดัดแปลงตามวิธีทดสอบหมายเลข 475 “Genetic Toxicology : *In vivo* Mammalian Bone Marrow Cytogenetic Test – Chromosomal Analysis” ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (1997).

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

ก่อนทำการทดสอบ นำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24±1 องศาเซลเซียส. จัดแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว เพศผู้ 5ตัวและเพศเมีย 5 ตัว, ดังนี้.

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control) ป้อนน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากลุ่มทดลอง.

กลุ่มที่ 2 ป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ (BD) 1 ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว.

กลุ่มที่ 3 ป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ (BD) 2 ขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว.

กลุ่มที่4 ฉีดสารละลาย Cyclophosphamide เข้าช่องท้องขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว.

<u>การเตรียมสารทดสอบ</u>

- ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2 ความเข้มข้น 100 %.
- ชั่งสาร Cyclophosphamide 2.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตรได้สารละลายความเข้มข้น 2.4 กรัม %.

<u>วิธีการ</u>

หลังงดให้อาหารหนู 16 ชั่วโมง (ให้น้ำดื่มตามปกติ), ป้อนตัวอย่างทดสอบตามกลุ่มที่จัดไว้. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง หนูทุกตัวจะถูกทำให้ตายอย่างสงบโดยการให้สูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และทำการเก็บเซลล์ไขกระดูกจากกระดูกต้นขา เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์โครโมโซม โดยการย้อมสไลด์โครโมโซมด้วย Giemsa solution ที่เตรียมใหม่ทุกครั้งของการใช้. รวมทั้งกรองก่อนใช้ด้วยกระดาษกรอง No. 1. จากนั้น ทำการย้อมสไลด์ของโครโมโซม, ทิ้งไว้นานประมาณ 20 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำไหลสะอาด (running tap water) และผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air dry) ก่อนนำสไลด์มาอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์.

การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์โครโมโซมโดยเปรียบเทียบค่า Mitotic Index (%) และเปรียบเทียบความเสียหายของโครโมโซมระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Student's t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.

2.3.8 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ของผลิตภัณฑ์สบู่ดำ

การทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2 โดยวิธี MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay เป็นการทดสอบโดยใช้สาร tetrazolium salt ที่มีสีเหลืองอ่อน ซึ่งจะถูกเอนไซม์ชนิดแซ็กซิเนสดีไฮโดร-จีเนส ที่มีอยู่ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต เปลี่ยนเป็นผลึกสีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ (violet formazan crystal). ในกรณีที่เซลล์ตาย จะทำให้เอนไซม์ในไมโตคอนเดรียเสียสภาพ. จึงถูกพัฒนาเพื่อใช้หาปริมาณของเซลล์ที่รอดชีวิต โดยต้องทำการละลาย formazan crystal ด้วยสารละลาย DMSO และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 550-590 นาโนเมตร. ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผันตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อคำนวณและเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มควบคุม.

วิธีการทดสอบ

1. การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

- ดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ fibroblast (ATCC CCL-1 cell line) ที่เจริญขยายเต็มที่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร ออก และล้างเซลล์ด้วย PBS.

- เติม Trypsin/EDTA 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 3 นาที, เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM อีก 15 มิลลิลิตร ให้เซลล์อยู่ในลักษณะแขวนลอย.

- นำไปปั่นที่ 3000 rpm นาน 5 นาที, จากนั้น นับจำนวนเซลล์ด้วย Haematocytometer.

- เจือจางเซลล์ให้ได้ 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ประมาณ 20 มิลลิลิตร.

- ดูดเซลล์ที่เจือจางปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่แต่ละหลุมใน 96-well plate โดยเว้นแถวที่ 1 และ 12 เพื่อใช้เป็น blank.

- นำไปเพาะเลี้ยงใน CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนเซลล์แผ่ขยายเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) อย่างน้อยร้อยละ 80 ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม.

- เตรียมสารตัวอย่าง “ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2” นำมาละลายด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ MEM และ 1 % DMSO ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1, 5, 10, 15 และ 20 % v/v ที่ผ่านการกรองด้วย Syringe filter ขนาด 22 µM.

- เตรียมสารละลาย 1% DMSO ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM เพื่อใช้เป็น blank.

2. การทดสอบ

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจากแต่ละหลุมใน 96-well plate ที่มีเซลล์เจริญอย่างน้อยร้อยละ 80 และล้างด้วย PBS 1 ครั้ง. จากนั้น เติมสารละลายตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ (1, 5, 10, 15 และ 20 % v/v) รวมถึงสารละลายควบคุม ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงหลุมละ 200 ไมโครลิตร. นำเข้าตู้ CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.

3. การประเมินผลการทดสอบ

หลังจากปล่อยให้เซลล์สัมผัสกับไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 24 ชั่วโมง, ทำการวัดเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตโดย MTT assay ตามขั้นตอนดังนี้:

- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง, เติมสารละลาย MTT ขนาด 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในสารละลาย PBS ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม และอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 150 ไมโครลิตร/หลุม, บ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มเซลล์ที่ 37°ซ. นาน 4 ชั่วโมง.

- ดูดสารละลายทิ้ง, ล้างตะกอนด้วยการเติมสารละลาย DMSO 100 ไมโครลิตร, เขย่าเบาๆ นาน 15 นาที.

- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร, นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเทียบกับกลุ่มควบคุม

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการทดสอบการก่อความระคายเคืองผิวหนังกระต่าย

จากค่าเฉลี่ยคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่สัมผัสกับตัวอย่างทดสอบและน้ำกลั่น (บริเวณควบคุม) พบว่า กลีเซอรีนจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 ก่อให้เกิดอาการบวมแดงเล็กน้อยในชั่วโมงแรก เมื่อเทียบกับน้ำกลั่น. ส่วนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2 น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 และ 2 ไม่มีผลก่อให้เกิดอาการแดงและบวมของผิวหนังกระต่ายทุกตัวที่ใช้ในการทดสอบ (อาการแดงและอาการบวม เป็น 0), ดังแสดงในตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. คะแนนเฉลี่ยความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำ (n=3)

ตัวอย่างทดสอบ	ระยะเวลาที่สังเกตอาการ (ชั่วโมง)							
	1		24		48		72	
	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม
กลีเซอรีนจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2	1	1	0	0	0	0	0	0
ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0
ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0
น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0
น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0

3.2 ผลการทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อดวงตากระต่าย

ภายหลังจากหยอดตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำทั้ง 5 ตัวอย่าง พบว่า ในชั่วโมงที่ 1 กลีเซอรีนจากสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 มีผลต่อเยื่อบุตากระต่ายในระดับที่มีการแดงและบวมของเส้นเลือดตามากที่สุด และอาการดังกล่าวหายเป็นปกติภายใน 24 ชั่วโมง ในทุกตัวอย่าง, ดังแสดงในตารางที่ 2.

ตารางที่ 2. ค่าเฉลี่ยคะแนนความผิดปกติต่อดวงตากระต่ายหลังหยอดตัวอย่างทดสอบ (n=3

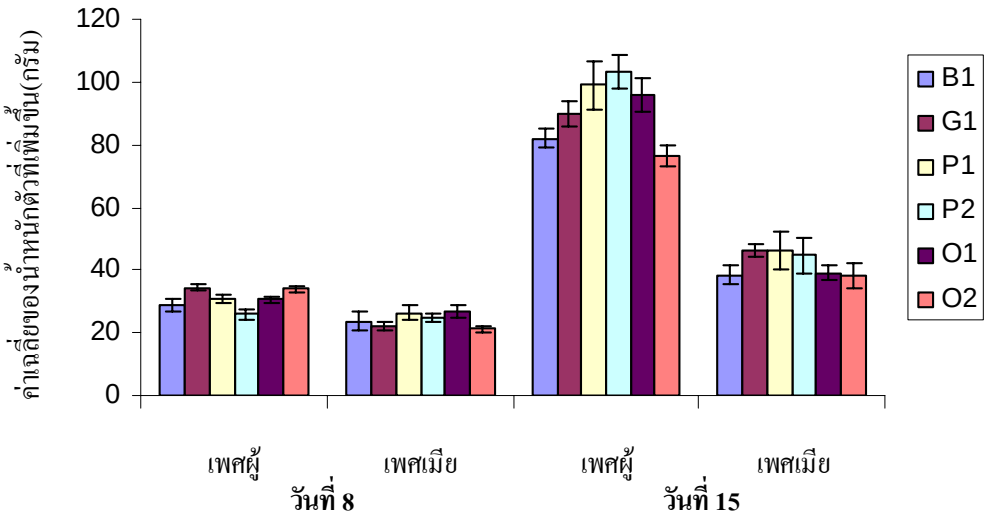
ตัวอย่างทดสอบ	ความผิดปกติของดวงตา ตรวจวัดคะแนนที่ (ชั่วโมง)																			
	1					24					48					72				
	กระจกตา	ม่านตา		เยื่อบุลูกตา		กระจกตา	ม่านตา		เยื่อบุลูกตา		กระจกตา	ม่านตา		เยื่อบุลูกตา		กระจกตา	ม่านตา		เยื่อบุลูกตา	
	ความขุ่น	บวม/แดง	ปฏิกิริยาต่อแสง	แดง	บวม	ความขุ่น	บวม/แดง	ปฏิกิริยาต่อแสง	แดง	บวม	ความขุ่น	บวม/แดง	ปฏิกิริยาต่อแสง	แดง	บวม	ความขุ่น	บวม/แดง	ปฏิกิริยาต่อแสง	แดง	บวม
กลีเซอรีนจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2	0	0	0	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก

ภายหลังจากป้อนผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำแต่ละชนิดขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (มก./กก.) น้ำหนักตัวให้หนูขาว พบว่า หนูทุกตัวในทุกกลุ่มมีอาการปกติและหนูทุกตัวมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลาสังเกตผลนาน 14 วัน และตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในจากการชันสูตรซากเมื่อสิ้นสุดการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3. นอกจากนี้ยังพบว่า ผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำทั้ง 5 ชนิดไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในหนูขาว (รูปที่ 1).

ตารางที่ 3. อัตราการตายและผลการชันสูตรอวัยวะภายในจากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากตลอดการทดลองนาน 14 วัน ภายหลังได้รับผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำ

ตัวอย่างทดสอบ/ขนาด	อัตราการตาย (จำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย / จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบ)			ผลการชันสูตรอวัยวะภายใน (Gross Pathology)	
	เพศผู้	เพศเมีย	รวม	เพศผู้	เพศเมีย
น้ำกลั่น (ปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดลอง)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
กลีเซอรีนจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1กระบวนการที่ 1 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1กระบวนการที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ



รูปที่ 1. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวภายหลังจากการกินผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำ ระยะเวลา 8 และ 15 วัน.

B 1 : น้ำกลั่น (ปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดลอง)

G 1 : กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)

P 1 : ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)

P 2 : ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)

O 1 : น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)

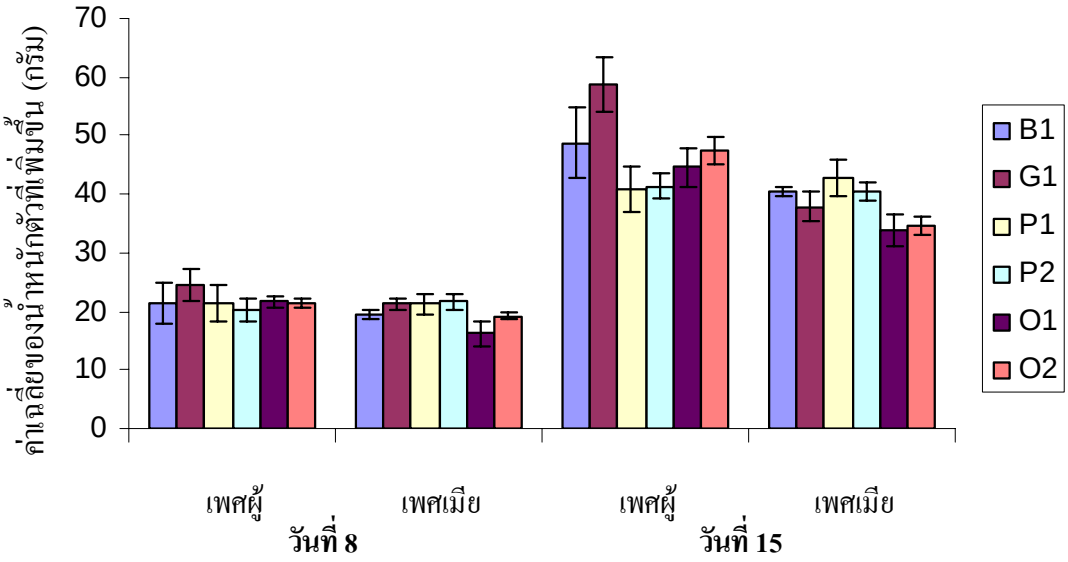
O 2 : น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)

3.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง

ภายหลังจากนำผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำแต่ละชนิดขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (มก./กก.) น้ำหนักตัวให้สัมผัสผิวหนังหนูขาวนาน 24 ชั่วโมง พบว่า หนูทุกตัวในทุกกลุ่มมีอาการปกติและมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลาสังเกตผลนาน 14 วัน, รวมทั้ง ตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในจากการชันสูตรซากเมื่อสิ้นสุดการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4. นอกจากนี้ยังพบว่า ผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำทั้ง 5 ชนิดไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในหนูขาวทางผิวหนัง (รูปที่ 2).

ตารางที่ 4. อัตราการตายและผลการชันสูตรอวัยวะภายในจากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนังตลอดการทดลองนาน 14 วัน ภายหลังได้สัมผัสผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำ

ตัวอย่างทดสอบ/ขนาด	อัตราการตาย (จำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย / จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบ)			ผลการชันสูตรอวัยวะภายใน (Gross Pathology)	
	เพศผู้	เพศเมีย	รวม	เพศผู้	เพศเมีย
น้ำกลั่น (ปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดลอง)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
กลีเซอรีนจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
ไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
ไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ
น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)	0/5	0/5	0/10	ปกติ	ปกติ



รูปที่ 2. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูขาวภายหลังจากการสัมผัสผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำทางผิวหนัง ระยะเวลา 8 และ 15 วัน.

B 1 : น้ำกลั่น (ปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดลอง)

G 1 : กลีเซอรีน จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)

P 1 : ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)

P 2 : ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)

O 1 : น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)

O 2 : น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2 (2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว)

3.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันจากการสูดดม

ผลจากการสูดดม “ไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1 และไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2” ขนาด 1.5 ppm/0.34 m^3 (1.5 มก./ล.) โดยการฉีดพ่นด้วยเครื่อง atomizer ภายในตู้กระจกระบบปิดเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และสังเกตอาการผิดปกติของหนูทดลองที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ภายหลังสูดดม, พบว่า หนูถีบจักรทดลองทุกตัวรอดชีวิตและมีอาการปกติตลอดจนสิ้นสุดระยะเวลาการทดสอบ. จากผลการทดลองแสดงว่า “ไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 1 และไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 กระบวนการที่ 2” ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันทางการสูดดมที่ขนาด 1.5 มก./ล. ในหนูถีบจักร (ตารางที่ 5).

ตารางที่ 5. ผลอัตราการตายและอาการผิดปกติของหนูถีบจักรจากการสูดดมไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำจากกขบวนการที่ 1 และ 2

ตัวอย่างทดสอบ /เกณฑ์ในการทดสอบ	ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่ 1	ไบโอดีเซล จากน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่ 2
อัตราการตาย (จำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย / จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบ)		
: ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	0/10	0/10
: ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	0/10	0/10
อาการผิดปกติของสัตว์ทดลอง		
: อาการสั่น (Tremor)	–	–
: อาการชัก (Convulsion)	–	–
: การขับน้ำลาย (Salivation)	–	–
: ท้องเสีย (Diarrhea)	–	–
: เฉื่อยชา (Lethalgy)	–	–
: หลับ (Sleep)	–	–
: โคม่า (Coma)	–	–

หมายเหตุ: √ = พบ

– = ไม่พบ

3.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่ออัวยวะภายในสัตว์ทดลอง

3.6.1 อาการทางพิษวิทยาที่พบในสัตว์ทดลอง

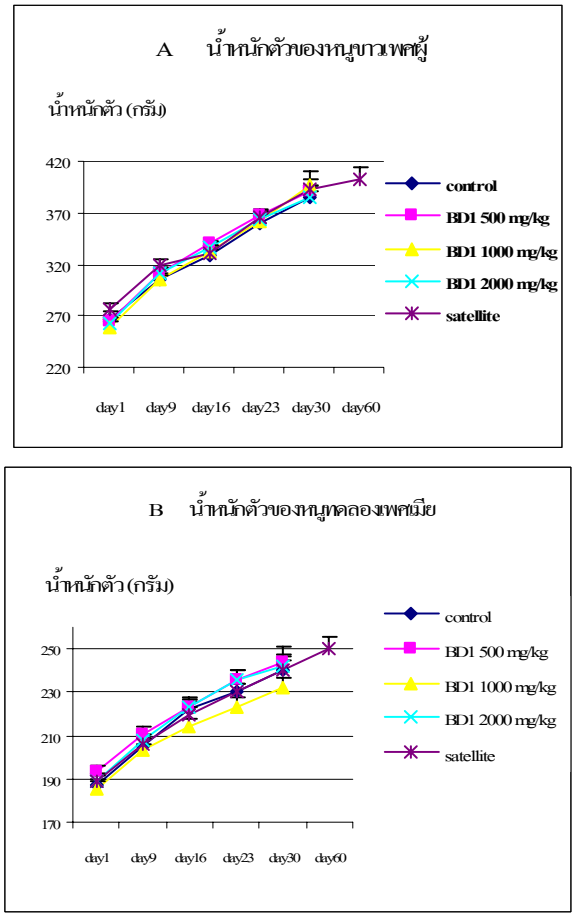
ภายหลังป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำจากกระบวนการที่ 1 และ 2, สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันนาน 30 วัน และ 60 วันสำหรับกลุ่ม Satellite, พบว่าหนูทุกตัวมีอาการปกติ ดังแสดงในตารางที่ 6.

ตารางที่ 6. อาการทางพิษวิทยาของหนูขาวทดลองภายหลังป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำจากกระบวนการที่ 1 และ 2

อาการทางพิษวิทยา	ผลการตรวจ	
	ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่ 1	ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่ 2
	พบ	ไม่พบ
Hunched posture	-	/
Piloerection	-	/
Oedema	-	/
Erythema	-	/
Fasciculation	-	/
Ataxia	-	/
Convulsions	-	/
Tremor	-	/
Drowsiness	-	/
Lacrimation	-	/
Nasal discharge	-	/
Diarrhea	-	/
Feces	-	/
Diuresis	-	/
Dead	-	/

3.6.2 ผลต่อการเจริญเติบโต

หลังจากป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำจากกระบวนการ 1 และ 2 ที่ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และป้อนน้ำกลั่นให้แก่หนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมีย ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน และ 60 วันสำหรับกลุ่ม Satellite, พบว่า ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการ1 และ 2 ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของหนูขาว ดังแสดงในรูปที่ 3.

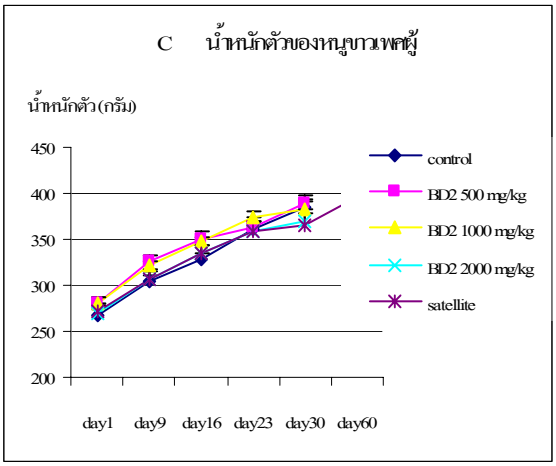


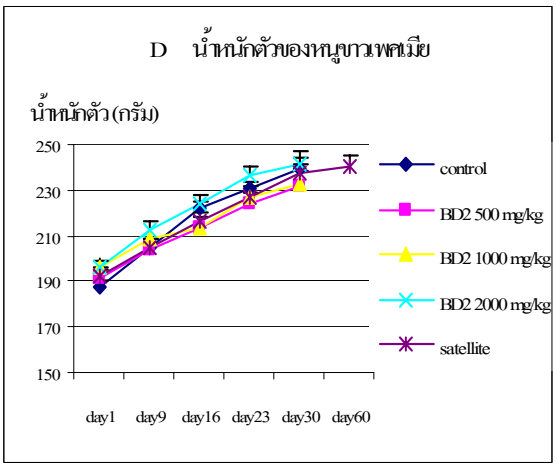
รูปที่ 3. น้ำหนักหนูขาวในระยะเวลา 30 วัน และ 60 วันภายหลังได้รับไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการ 1 ของหนูเพศผู้.

(A) เพศเมีย

(B) ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่2 ของหนูเพศผู้

(C) เพศเมีย (D)





รูปที่ 3. (ต่อ) น้ำหนักหนูขาวในระยะเวลา 30 วัน และ 60 วันภายหลังได้รับไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการ 1 ของหนูเพศผู้.

(A) เพศเมีย

(B) ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่2 ของหนูเพศผู้

(C) เพศเมีย (D)

3.6.3 ผลต่อเคมีคลินิกของเลือด

หลังจากป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำจากกระบวนการที่ 1 และ 2 ที่ขนาด 500, 1,000, และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และวัดค่าเคมีคลินิกในเลือด ได้แก่ Alanine Transminase(ALT), Aspartate Transaminase(AST), Creatinine และ Urea Nitrogen ของหนูขาวเพศผู้ (ตารางที่ 7) และเพศเมีย (ตารางที่ 8), พบว่า ค่าชีวเคมีในเลือดของกลุ่มทดสอบ 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวของทั้งเพศผู้และเพศเมีย ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 1 และค่าชีวเคมีในเลือดของกลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน (satellite) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 2.

3.6.4 ผลต่อโลหิตวิทยา

หลังจากป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำจากกระบวนการที่ 1 และ 2 ที่ขนาด 500, 1000, และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวและวัดค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา คือ WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC และ PLT ของหนูขาวเพศผู้ (ตารางที่ 9) และเพศเมีย (ตารางที่ 10), พบว่า ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำทั้งสองกระบวนการไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศผู้ทุกพารามิเตอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 1. ยกเว้นไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 2 พบว่า ค่า MCV ของหนูขาวเพศเมียมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) แบบไม่ขึ้นตรงต่อขนาดความเข้มข้น. อย่างไรก็ตาม ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูกลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 2.

ตารางที่ 7. ผลทางเคมีคลินิก (Blood chemistry) ของหนู Wistar เพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และ กระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก	กลุ่มควบคุม		ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำต่อหนูขาวเพศผู้ (Mean±SE)							
	กลุ่มควบคุมที่ 1	กลุ่มควบคุมที่ 2	500 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		1,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน	
			P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1. Urea Nitrogen	15.33 ± 1.2	31.00 ± 2.5	16.00 ± 0.5	15.00 ± 1.0	16.00 ± 1.1	16.33 ± 0.6	14.66 ± 0.8	17.33 ± 0.8	30.00 ± 0.5	28.66 ± 1.8
2. Creatinine	0.43 ± 0.0	0.50 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.40 ± 0.0	0.43 ± 0.0	0.46 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.46 ± 0.0	0.46 ± 0.0	0.53 ± 0.0
3. Aspartate Transminase (AST)	87.03 ± 5.6	115.00 ± 6	73.9 ± 23.5	105.03 ± 12.0	92.33 ± 2.6	65.43 ± 27.08	68.82 ± 31.4	94.10 ± 5.9	91.73 ± 11.3	110.80 ± 13.4
4. Alanine Transminase (ALT)	44.66 ± 9.9	95.00 ± 23.7	34.33 ± 2.3	49.33 ± 10.1	40.66 ± 2.9	54.66 ± 12.2	39.00 ± 4.7	43.00 ± 2.6	121.33 ± 64.9	138.33 ± 49.3

กระบวนการที่ 1 : P1 และ กระบวนการที่ 2 : P2.

กลุ่มควบคุมที่ 1 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 500-2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม.

กลุ่มควบคุมที่ 2 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน.

ตารางที่ 8. ผลทางเคมีคลินิก (Blood chemistry) ของหนู Wistar เพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และ กระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก	กลุ่มควบคุม		ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำต่อหนูขาวเพศเมีย (Mean±SE)							
	กลุ่มควบคุมที่ 1	กลุ่มควบคุมที่ 2	500 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		1,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน	
			P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1. Urea Nitrogen	22.33 ± 1.3	37.33 ± 6.3	18.33 ± 1.4	17.16 ± 1.2	20.00 ± 1.0	18.66 ± 2.8	18.00 ± 1.7	16.66 ± 1.7	35.66 ± 3.9	30.33 ± 1.5
2. Creatinine	0.63 ± 0.0	0.60 ± 0.0	0.56 ± 0.0	0.48 ± 0.0	0.60 ± 0.0	0.56 ± 0.0	0.50 ± 0.0	0.63 ± 0.0	0.53 ± 0.0	0.56 ± 0.0
3. Aspartate Transminase (AST)	67.6 ± 5.6	84.73 ± 1.3	95.93 ± 2.2	100.21 ± 6.7	97.46 ± 3.6	73.06. ± 30.7	91.33 ± 2.7	93.43 ± 6.0	108 ± 1.5	127.66 ± 12.2
4. Alanine Transminase (ALT)	23.66 ± 2.1	54.66 ± 24.1	25.00 ± 1.5	37.16 ± 7.1	23.33 ± 1.7	25.66 ± 2.6	27.66 ± 1.2	24.00 ± 0.6	40.00 ± 10.0	40.33 ± 9.2

กระบวนการที่ 1 : P1 และ กระบวนการที่ 2 : P2.

กลุ่มควบคุมที่ 1 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 500-2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม.

กลุ่มควบคุมที่ 2 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน.

ตารางที่ 9. ผลทางโลหิตวิทยา (Hematology) ของหนู Wistar เพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และ กระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม		ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำต่อหนูขาวเพศผู้ (Mean±SE)							
	กลุ่มควบคุมที่ 1	กลุ่มควบคุมที่ 2	500 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		1,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน	
			P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1. WBC $X10^3$	5.30 ± 0.7	5.91 ± 0.1	3.18 ± 0.5	5.77 ± 0.9	4.49 ± 0.0	4.77 ± 0.5	5.62 ± 0.6	4.60 ± 0.0	5.39 ± 0.4	6.89 ± 1.0
2. RBC X 10^6	8.45 ± 0.0	8.54 ± 0.1	8.31 ± 0.2	8.13 ± 0.2	7.94 ± 0.3	8.77 ± 0.3	7.99 ± 0.1	8.36 ± 0.3	8.32 ± 0.2	8.36 ± 0.0
3. Hb	16.83 ± 0.3	17.03 ± 0.0	16.46 ± 0.1	16.23 ± 0.3	16.30 ± 0.3	17.13 ± 0.2	16.66 ± 0.2	17.03 ± 0.3	16.63 ± 0.3	17.26 ± 0.0
4. Hct	47.66 ± 2.1	51.00 ± 0.5	45.66 ± 0.66	47.33 ± 0.88	45.00 ± 1.5	52.66 ± 1.2	46.66 ± 0.9	52.00 ± 1.7	49.66 ± 1.3	50.66 ± 0.3
5. MCV	56.06 ± 1.8	59.70 ± 0.1	55.16 ± 0.8	58.30 ± 0.4	56.53 ± 0.3	59.90 ± 1.5	58.43 ± 0.2	59.10 ± 3.7	60.03 ± 1.0	60.33 ± 0.6
6. MCH	19.9 ± 0.2	19.93 ± 0.3	19.83 ± 0.3	19.96 ± 0.1	20.53 ± 0.4	19.53 ± 0.4	20.90 ± 0.3	20.36 ± 0.5	20.00 ± 0.4	20.66 ± 0.2
7. MCHC	35.56 ± 0.7	33.4 ± 0.4	35.96 ± 0.3	34.26 ± 0.0	36.33 ± 0.5	32.66 ± 0.3	35.70 ± 0.5	32.63 ± 0.5	33.50 ± 0.3	34.26 ± 0.0
8. PLT count X 10^5	4.98± 0.2	5.68 ± 0.4	4.90 ± 0.4	3.94 ± 0.4	5.22 ± 0.0	5.49 ± 0.4	5.57 ± 0.5	5.05 ± 0.2	6.83 ± 0.2	6.44 ± 0.6

กระบวนการที่ 1 : P1 และ กระบวนการที่ 2 : P2.

กลุ่มควบคุมที่ 1 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 500-2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม.

กลุ่มควบคุมที่ 2 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน.

ตารางที่ 10. ผลทางโลหิตวิทยา (Hematology) ของหนู Wistar เพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และ กระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม		ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำต่อหนูขาวเพศเมีย (Mean±SE)							
	กลุ่มควบคุมที่ 1	กลุ่มควบคุมที่ 2	500 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		1,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน	
			P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1. WBC X10^3	4.39 ± 0.4	5.12 ± 0.4	3.86 ± 0.2	2.22 ± 0.7	5.45 ± 0.4	4.39 ± 0.4	3.94 ± 0.4	3.81 ± 0.5	4.87 ± 0.7	4.87 ± 0.7
2. RBC X 10^6	7.61 ± 0.3	8.27 ± 0.2	7.72 ± 0.0	5.96 ± 1.9	7.52 ± 0.2	8.45 ± 0.2	7.45 ± 0.1	7.41 ± 0.1	8.18 ± 0.1	8.18 ± 0.1
3. Hb	15.23 ± 0.6	16.88 ± 0.1	15.80 ± 0.1	11.70 ± 5.1	15.06 ± 0.1	16.98 ± 0.1	15.33 ± 0.1	15.36 ± 0.3	16.76 ± 0.2	16.76 ± 0.2
4. Hct	43.33 ± 2.4	49.33 ± 0.9	43.66 ± 0.33	37.00 ± 12.0	41.33 ± 0.6	50.83 ± 1.0	42.66 ± 0.9	44.66 ± 0.6	49.33 ± 0.6	49.33 ± 0.6
5. MCV	56.43 ± 1.0	59.73 ± 0.5	56.30 ± 0.8	61.03 ± 0.9**	55.06 ± 0.5	60.06 ± 0.9**	57.13 ± 0.8	60.03 ± 0.4**	60.06 ± 0.8	60.06 ± 0.8
6. MCH	20.00 ± 0.4	20.4 ± 0.3	20.46 ± 0.1	16.46 ± 4.8	20.06 ± 0.3	20.13 ± 0.4	20.56 ± 0.0	20.73 ± 0.1	20.46 ± 0.2	20.46 ± 0.2
7. MCHC	35.50 ± 0.7	34.2 ± 0.5	36.36 ± 0.6	26.73 ± 7.7	36.40 ± 0.3	33.53 ± 0.4	36.03 ± 0.6	34.53 ± 0.3	34.06 ± 0.1	34.06 ± 0.1
8. PLT count X 10^5	4.99 ± 0.7	5.80 ± 0.4	5.54 ± 0.6	3.95 ± 0.2	5.22 ± 0.6	5.60 ± 0.2	4.85 ± 0.5	5.93 ± 0.0	6.52 ± 0.8	6.52 ± 0.8

กระบวนการที่ 1 : P1 และ กระบวนการที่ 2 : P2.

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 1 ที่ $p< 0.01$.

กลุ่มควบคุมที่ 1 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 500-2,000 มก./กก.

กลุ่มควบคุมที่ 2 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 2,000 มก./กก. ระยะหยุดการป้อน 30 วัน.

3.6.5 ผลต่อเคมีคลินิกของปัสสาวะ

หลังจากป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำจากกระบวนการที่ 1 และ 2 ที่ขนาด 500, 1000, และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว, พบว่า ค่าเคมีคลินิกในปัสสาวะของหนูขาวเพศผู้ (ตารางที่ 11) และเพศเมีย (ตารางที่ 12) ดังพารามิเตอร์ต่อไปนี้ Specific Gravity, Leukocytes, Nitrite, Protein, Glucose, Ketone, Uribilinogen, Bilirubin และ Erythrocytes มีค่าปกติ, ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 1. กลุ่มทดสอบระยะหยุดการป้อนยา 30 วัน ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีค่าทางเคมีคลินิกในปัสสาวะไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 2 เช่นกัน.

3.6.6 ผลต่อน้ำหนักสัมพัทธ์อวัยวะภายใน (relative internal organ weight)

ผลต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในของหนูขาวหลังจากได้รับไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2 ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ต่อเนื่องนาน 30 วัน, พบว่า ค่าน้ำหนักสัมพัทธ์อวัยวะภายในของหนูเพศเมียทุกอวัยวะ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบ-เทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมที่1. ขณะที่ในหนูเพศผู้ พบว่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของปอดและหัวใจในกลุ่มทด- สอบที่ได้รับน้ำมันสบู่ดำกระบวนการ 2 ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 1 ในเพศเดียวกัน.

3.6.7 ผลทางพยาธิสภาพและจุลพยาธิวิทยาของไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ

เมื่อเสร็จสิ้นระยะเวลาการป้อนไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำให้หนูขาวทดสอบเป็นเวลา 30 วัน หนูแต่ละตัวจะถูกทำการุณยฆาต (euthanasia) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์, แล้วเปิดหน้าท้องเพื่อตรวจหาพยาธิสภาพของอวัยวะภายในต่างๆ ในระดับที่มองด้วยตาเปล่า (gross pathology examination) ได้แก่ สมอง, ปอด, ตับ, ไต, หัวใจ, รังไข่ และอัณฑะ. บันทึกความผิดปกติของอวัยวะเหล่านั้น เช่น สี, ขนาด และ ตำแหน่ง. หลังจากนั้น เก็บตัวอย่างอวัยวะดังกล่าวแช่ในสาร buffered formalin ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10, เพื่อนำไปเตรียมเป็นสไลด์ สำหรับตรวจหาความผิดปกติในระดับจุลพยาธิต่อไป.

ตารางที่ 11. ผลทางเคมีคลินิกของปัสสาวะ (Urinalysis) หนู Wistar เพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และกระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิกของปัสสาวะ	กลุ่มควบคุม		ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำต่อหนูขาวเพศผู้ (Mean±SE)							
	กลุ่มควบคุมที่ 1	กลุ่มควบคุมที่ 2	500 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		1,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มก. /กก.		2,000 มก. /กก. ระยะหยุดการป้อน 30 วัน	
			P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1.Specific Gravity	1.0167 ± 0.0	1.0183 ± 0.0	1.0133 ± 0.0	1.0167 ± 0.0	1.0150 ± 0.0	1.016 ± 0.0	1.0117 ± 0.0	1.0150 ± 0.0	1.0150 ± 0.0	1.0167 ± 0.0
2.pH	9.00 ± 0.0	8.66 ± 0.3	8.66 ± 0.3	8.33 ± 0.3	9.00 ± 0.0	8.66 ± 0.3	8.33 ± 0.3	8.66 ± 0.3	9.00 ± 0.0	9.00 ± 0.0
3.Leukocyte	1.33 ± 0.3	0.66 ± 0.6	2.33 ± 0.3	0.66 ± 0.3	1.66 ± 0.3	1.33 ± 0.8	1.66 ± 0.3	0.66 ± 0.6	1.00 ± 0.6	1.66 ± 0.3
4.Nitrite	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.33 ± 0.3
5.Protein	0.00 ± 0.0	0.66 ± 0.6	1.00 ± 1.0	0.00 ± 0.0	0.33 ± 0.3	0.66 ± 0.6	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.33 ± 0.3	0.00 ± 0.0
6.Glucose	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
7.Ketone	0.00 ± 0.0	1.00 ± 0.6	0.66 ± 0.3	0.00 ± 0.0	0.33 ± 0.3	0.33 ± 0.3	0.33 ± 0.3	0.00 ± 0.0	0.66 ± 0.3	0.66 ± 0.3
8.Uribilinogen	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
9.Bilirubin	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
10.Erythrocytes	1.00 ± 1.0	0.33 ± 0.3	1.00 ± 1.0	1.33 ± 0.6	1.00 ± 1.0	0.00 ± 0.0	3.00 ± 0.0	0.66 ± 0.6	0.00 ± 0.0	1.00 ± 0.5

กระบวนการที่ 1 : P1 และ กระบวนการที่ 2 : P2.

กลุ่มควบคุมที่ 1 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 500-2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม.

กลุ่มควบคุมที่ 2 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน.

ตารางที่ 12. ผลทางเคมีคลินิกของปัสสาวะ (Urinalysis) หนู Wistar เพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และกระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน

พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิกของปัสสาวะ	กลุ่มควบคุม		ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำต่อหนูขาวเพศเมีย (Mean±SE)							
	กลุ่มควบคุมที่ 1	กลุ่มควบคุมที่ 2	500 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		1,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน	
			P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1.Specific Gravity	1.0133 ± 0.0	1.0167 ± 0.0	1.0133 ± 0.0	1.0133 ± 0.0	1.0150 ± 0.0	1.0183 ± 0.0	1.0167 ± 0.0	1.0167 ± 0.0	1.0150 ± 0.0	1.0167 ± 0.0
2.pH	8.33 ± 0.3	8.66 ± 0.3	9.00 ± 0.0	8.33 ± 0.3	9.00 ± 0.0	8.66 ± 0.33	8.66 ± 0.3	8.33 ± 0.3	8.66 ± 0.3	8.66 ± 0.3
3.Leukocyte	0.33 ± 0.3	0.00 ± 0.0	0.33 ± 0.3	0.00 ± 0.0	1.00 ± 0.0	0.33 ± 0.3	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	1.00 ± 0.5
4.Nitrite	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.33 ± 0.3	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.66 ± 0.3	0.33 ± 0.3	0.33 ± 0.3
5.Protein	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.33 ± 0.3
6.Glucose	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
7.Ketone	0.33 ± 0.3	0.33 ± 0.3	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	1.00 ± 0.0
8.Uribilinogen	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
9.Bilirubin	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
10.Erythrocytes	0.33 ± 0.3	0.66 ± 0.6	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.33 ± 0.3	0.33 ± 0.3

กระบวนการที่ 1 : P1 และ กระบวนการที่ 2 : P2.

กลุ่มควบคุมที่ 1 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 500-2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม.

กลุ่มควบคุมที่ 2 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน.

ตารางที่ 13. น้ำหนักสัมพัทธ์อวัยวะภายในของหนู Wistar เพศผู้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และ กระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน

อวัยวะ	กลุ่มควบคุม		ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำต่อหนูขาวเพศผู้ (Mean±SE)							
	กลุ่มควบคุมที่ 1	กลุ่มควบคุมที่ 2	500 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		500 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มก. /กก.		2,000 มก. /กก. ระยะหยุดการป้อน 30 วัน	
			P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1. Brain	0.0051±0.004	0.0050±0.002	0.0051±0.000	0.0060±0.000	0.0056±0.000	0.0059±0.000	0.0055±0.000	0.0065±0.000	0.0060±0.000	0.0049±0.000
2. Lung	0.0045±0.004	0.0042±0.000	0.0042±0.000	0.0052±0.000	0.0045±0.000	0.0054±0.000	0.0040±0.000	0.0060±0.000**	0.0050±0.000	0.0043±0.000
3. Liver	0.0396±0.039	0.0327±0.002	0.0407±0.002	0.0380±0.001	0.0352±0.003	0.0416±0.003	0.0375±0.002	0.0438±0.000	0.0337±0.001	0.0325±0.001
4. Thymus	0.0017±0.001	0.0015±0.000	0.0010±0.000**	0.0016±0.000	0.0018±0.000	0.0018±0.000	0.0016±0.000	0.0017±0.000	0.0017±0.000	0.0012±0.000
5. Heart	0.0035±0.003	0.0032±0.000	0.0042±0.000**	0.0037±0.000	0.0035±0.000	0.0038±0.000	0.0041±0.000**	0.0047±0.000**	0.0035±0.000	0.0036±0.000
6. Kidney	0.0089±0.008	0.0089±0.000	0.0094±0.000	0.0089±0.000	0.0089±0.000	0.010±0.000	0.0097±0.000	0.0101±0.000	0.0085±0.000	0.0076±0.000
7. Spleen	0.0022±0.002	0.0022±0.000	0.0018±0.000	0.0021±0.000	0.0019±0.000	0.0024±0.000	0.0020±0.000	0.0024±0.000	0.0024±0.000	0.0019±0.000
8. Intestine	0.0576±0.003	0.0725±0.007	0.0621±0.006	0.0671±0.003	0.0639±0.003	0.0667±0.004	0.0621±0.007	0.0674±0.077	0.0768±0.005	0.0608±0.007
9. Testis	0.0145±0.001	0.0181±0.003	0.0172±0.006	0.0165±0.003	0.0166±0.001	0.0178±0.000	0.0162±0.000	0.0201±0.002	0.0172±0.001	0.0171±0.001

กระบวนการที่ 1 : P1 และ กระบวนการที่ 2 : P2 ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 1 ที่ $p< 0.01$.

กลุ่มควบคุมที่ 1 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 500-2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม.

กลุ่มควบคุมที่ 2 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน.

ตารางที่ 14. น้ำหนักสัมพัทธ์อวัยวะภายในของหนู Wistar เพศเมียในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับผลิตภัณฑ์น้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 (P1) และกระบวนการที่ 2 (P2) เมื่อสิ้นสุดการทดลองครบ 30 วันและ กลุ่มระยะหยุดการป้อน 30 วัน

อวัยวะ	กลุ่มควบคุม		ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำต่อหนูขาวเพศเมีย (Mean±SE)							
	กลุ่มควบคุมที่ 1	กลุ่มควบคุมที่ 2	500 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		500 มิลลิกรัม /กิโลกรัม		2,000 มก. /กก.		2,000 มก. /กก. ระยะหยุดการป้อน 30 วัน	
			P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1. Brain	0.0090±0.000	0.0074±0.000	0.0091±0.000	0.0093±0.000	0.0091±0.000	0.0084±0.000	0.0090±0.000	0.0091±0.000	0.0084±0.000	0.0074±0.000
2. Lung	0.0060±0.000	0.0050±0.000	0.0094±0.002	0.0070±0.000	0.0083±0.001	0.0083±0.001	0.0123±0.003	0.0087±0.001	0.0059±0.000	0.0050±0.000
3. Liver	0.0393±0.001	0.0320±0.001	0.0381±0.001	0.0394±0.002	0.0436±0.000	0.0442±0.000	0.0439±0.002	0.0434±0.001	0.0332±0.000	0.0320±0.001
4. Thymus	0.0021±0.000	0.0020±0.000	0.0025±0.000	0.0021±0.000	0.0020±0.000	0.0023±0.000	0.0024±0.000	0.0024±0.000	0.0020±0.000	0.0020±0.000
5. Heart	0.0043±0.000	0.0043±0.000	0.0044±0.000	0.0048±0.000	0.0047±0.000	0.0047±0.000	0.0052±0.000	0.0049±0.000	0.0040±0.000	0.0043±0.000
6. Kidney	0.0113±0.000	0.0097±0.000	0.0102±0.000	0.0112±0.000	0.0104±0.000	0.0110±0.000	0.0106±0.000	0.0119±0.001	0.0094±0.000	0.0097±0.000
7. Spleen	0.0027±0.000	0.0025±0.000	0.0030±0.000	0.0039±0.000	0.0031±0.000	0.0036±0.000	0.0033±0.000	0.0034±0.000	0.0027±0.000	0.0025±0.000
8. Intestine	0.0821±0.004	0.0674±0.006	0.0672±0.010	0.0786±0.000	0.0789±0.002	0.0767±0.005	0.0892±0.002	0.0865±0.008	0.0771±0.009	0.0674±0.006
9. Ovary	0.0114±0.002	0.0066±0.001	0.0109±0.005	0.0125±0.001	0.0103±0.001	0.0129±0.003	0.0112±0.002	0.0114±0.004	0.0065±0.001	0.0066±0.001

กระบวนการที่ 1 : P1 และ กระบวนการที่ 2 : P2.

กลุ่มควบคุมที่ 1 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 500-2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม.

กลุ่มควบคุมที่ 2 ใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบที่ 2,000 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ระยะหยุดการป้อน 30 วัน.

ผลการตรวจทางพยาธิจุลวิทยาแสดงผลดังต่อไปนี้:

ปอด

พบลักษณะการรวมตัวของ Eosinophil ปริมาณเล็กน้อยบริเวณหลอดลมฝอยและผนังของถุงลม กระจายในหนูทุกกลุ่ม และไม่สัมพันธ์กับขนาดความเข้มข้นของไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2. ส่วนผล peribroncial/peri-bronchiolar lymphoid foci ปริมาณเล็กน้อย พบกระจายในกลุ่มควบคุมและกลุ่มอื่นๆ และพบลักษณะ hemorrhage, congestion และ edema ของ parenchyma เพียงเล็กน้อย 1-2 ตัว. จากผลที่ปรากฏอาจสรุปได้ว่า พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นนั้น อาจเป็นผลจากการเลี้ยงดูและการจัดการสัตว์ทดลองมากกว่า เป็นผลจากความเป็นพิษของน้ำมันสบู่ดำกระ-บวนการ 1 และ2.

ตับ

พบลักษณะความเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของ hepatocyte ดังต่อไปนี้ centilobolar fatty change, kartomegaly and anisokaryosis, binucleation และ congestion ในปริมาณเล็กน้อย กระจายในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบต่างๆ อย่างไม่มีนัยสำคัญ ของไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2. นอกจากนี้ ยังพบลักษณะ mitosis ของ hepatocyte ปริมาณเล็กน้อย, เฉพาะในหนูเพศเมียที่ได้รับไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการ 2 ในขนาด 2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม.

ไต

ไม่พบลักษณะความเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคใดๆ ของ glomerular ในหนูทุกกลุ่ม. การเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคที่พบในปริมาณเล็กน้อยมีดังต่อไปนี้ congestion บริเวณ corticome-dullary junction, pyknosis ของเซลล์ proximal tubular epithelium, segment epithelium, distal tubular epithelium พบกระจายในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบต่างๆ อย่างไม่มีนัยสำคัญของไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2.

สมอง

ไม่พบลักษณะ vacuolation ของเนื้อสองส่วน white matter ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบในขนาดต่างๆ. อย่างไรก็ตาม พบลักษณะของ vacuolation ปริมาณเล็กน้อยที่บริเวณดังกล่าวในกลุ่มที่หยุดพักยา 30 วัน รวมทั้งกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงต่ออีก 30 วันของของไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2 ผลดังกล่าวอาจเกิดขึ้นจากขั้นตอนการทำสไลด์.

หัวใจ

พบลักษณะ fatty change ของ myocardial fiber ปริมาณเล็กน้อย กระจายในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2.

รังไข่

พบลักษณะ fatty change ของ luteal cell และ single cell necrosis/apoptosis ของ granulose cell เพียงเล็กน้อยในหนูทุกกลุ่ม.

อัณฑะ

ไม่พบลักษณะความเปลี่ยนทางจุลกายวิภาคใดๆ ในหนูทุกกลุ่ม.

3.7 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อโครโมโซมสัตว์ทดลอง

ผลจากการประเมินค่าความเป็นพิษต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว พบว่า “ไบโอดีเซล กระบวนการที่ 1 และ 2” ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีผลทำให้ค่า %Mitotic Index ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งหนูเพศผู้ (ตารางที่ 15) และเพศเมีย (ตารางที่ 16). แสดงว่า “ไบโอดีเซล กระบวนการที่ 1 และ 2” อาจมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ไขกระดูกเมื่อได้รับในปริมาณสูง ในขณะที่ไม่มีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อโครโมโซม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.

ตารางที่ 15. ผลการประเมินความเป็นพิษต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศผู้ หลังจากได้รับ "ไบโอดีเซล น้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่1 และ 2" ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว นาน 24 ชั่วโมง เทียบกับ Cyclophosphamide 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (n = 5)

กลุ่ม	ตัวอย่างทดสอบ	[a,b]Mitotic Index (%)	[a,c]ชนิดความเสียหายของโครโมโซม			จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เกิดความเสียหายต่อโครโมโซม
			Break	Exchange	Multiple Ab	
1	น้ำกลั่น	6.12 ± 0.20	0	0	0	0
2	ไบโอดีเซล 1	*4.90 ± 0.15	0	0	0	0
3	ไบโอดีเซล 2	*4.81 ± 0.18	0	0	0	0
4	Cyclophosphamide	*2.79 ± 0.1	*17.80 ± 3.1	*5.00 ± 1.1	*4.60 ± 1.7	*16.00 ± 2.1

[a] แสดงเป็นค่า Mean ± SEM

[b] Mitotic Index (M.I.) = นับจำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟสทั้งหมด 2,000 เซลล์ต่อหนู 1 ตัว

[c] ดูความเสียหายของโครโมโซมทั้งหมด 50 เซลล์ต่อหนู 1 ตัว

* แตกต่างจากกลุ่มที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p< 0.05$

ตารางที่ 16. ผลการประเมินความเป็นพิษต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศเมีย หลังจากได้รับ "ไบโอดีเซล น้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่1 และ 2" ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว นาน 24 ชั่วโมง Cyclophosphamide 50 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม (n = 5)

กลุ่ม	ตัวอย่างทดสอบ	[a,b]Mitotic Index (%)	[a,c]ชนิดความเสียหายของโครโมโซม			จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เกิดความเสียหายต่อโครโมโซม
			Break	Exchange	Multiple Ab	
1	น้ำกลั่น	6.05 ± 0.18	0	0	0	0
2	ไบโอดีเซล 1	*4.66 ± 0.21	0	0	0	0
3	ไบโอดีเซล 2	*4.43 ± 0.20	0	0	0	0
4	Cyclophosphamide	*2.73± 0.2	*8.80 ± 1.9	*7.20 ± 1.5	*7.60 ± 4.3	*21.40 ± 2.85

[a] แสดงเป็นค่า Mean ± SEM

[b] Mitotic Index (M.I.) = นับจำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟสทั้งหมด 2,000 เซลล์ต่อหนู 1 ตัว

[c] ดูความเสียหายของโครโมโซมทั้งหมด 50 เซลล์ต่อหนู 1 ตัว

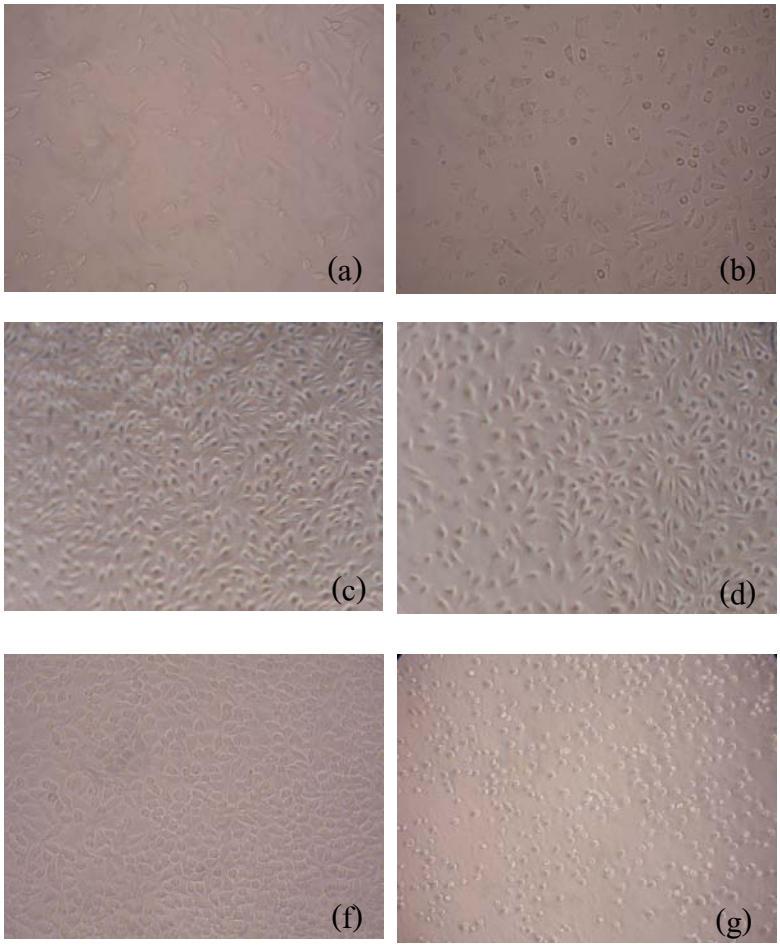
* แตกต่างจากกลุ่มที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p< 0.05$

3.8 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ของไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % โดยวิธี MTT assay, พบว่า ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดลดลง ตามความเข้มข้นของสารละลายไบโอดีเซลที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, ซึ่งเป็นผลจากการที่สารละลายไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำมีผลต่อไมโตรคอนเดรียของเซลล์ โดยไปมีผลยับยั้งการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ L929. ผลจากการคำนวณสรุปได้ว่า ระดับความเข้มข้นของ “ไบโอดีเซลชนิดที่ 1 และ 2” ที่มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ลดลงกึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ ที่ระดับ 17.09 และ 16.36 %v/v, ตามลำดับ.

ตารางที่ 17. ความเข้มข้นของไบโอดีเซลกระบวนการที่ 1 และ 2 ที่ 50 % ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ L 929

ตัวอย่างทดสอบ	IC_{50}
ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการ 1	17.09 %v/v
ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการ 2	16.36 %v/v



รูปที่ 4. ลักษณะของเซลล์เมื่อได้รับไบโอดีเซลกระบวนการ ที่ 1 และ 2 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.

(a) : แสดงภาพถ่ายเซลล์เมื่อสัมผัส 20%v/v Biodiesel กระบวนการที่ 1 ครบ 24 h.

(b) : แสดงภาพถ่ายเซลล์เมื่อสัมผัส 20%v/v Biodiesel กระบวนการที่ 2 ครบ 24 h.

(c) : แสดงภาพถ่ายเซลล์เมื่อสัมผัส 5%v/v Biodiesel กระบวนการที่ 1 ครบ 24 h.

(d) : แสดงภาพถ่ายเซลล์เมื่อสัมผัส 5%v/v Biodiesel กระบวนการที่ 2 ครบ 24 h.

(f) : แสดงภาพถ่ายเซลล์กลุ่มควบคุมเมื่อไม่ได้สัมผัสสารทดสอบ (Negative control) ครบ 24 h.

(g) : แสดงภาพถ่ายเซลล์กลุ่มควบคุมเมื่อสัมผัส 5% DMSO (Positive control) ครบ 24 h.

4. สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากเมล็ดสบู่ดำ 5 ชนิด ได้แก่ กลีเซอรีน น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่1 กระบวนการที่ 2, น้ำมันสบู่ดำ แหล่งที่ 1 (สุพรรณบุรี), น้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 2 (ปทุมธานี),ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำแหล่งที่ 1 จากกระบวนการที่ 1 และ 2. โดยกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ 1 เป็นกระบวนการที่ทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นสมบูรณ์, ขณะที่กระบวนการที่ 2 เป็นกระบวนการที่ทำปฏิกิริยาและทำการแยกชั้น โดยยังไม่ผ่านกระบวนทำให้บริสุทธิ์, สามารถสรุปผลได้ดังนี้:

1. ผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำทั้ง 5 ชนิด มีเพียงกลีเซอรีนชนิดเดียวที่มีผลก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายในชั่วโมงที่ 1, จากนั้น อาการบวมแดงที่พบจะหายเป็นปกติ อาจจะเป็นผลจากกลีเซอรีนที่ได้มาจากกระบวนที่ 2 ซึ่งเป็นกระบวนการที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์.

2. ผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำทั้ง 5 ชนิด มีผลก่อความระคายเคืองต่อดวงตาภายใน 24 ชั่วโมง โดยจะพบว่า กลีเซอรีนก่อให้เกิดอาการบวมและแดงต่อเยื่อบุตารุนแรงกว่าตัวอย่างอื่นๆ. อย่างไรก็ตาม หลังจาก 24 ชั่วโมง อาการบวมและแดงของเยื่อบุตาจากทุกตัวอย่างจะหายเป็นปกติ. แสดงให้เห็นว่า ความไม่บริสุทธิ์ของกลีเซอรีนอาจมีสารที่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อดวงตา.

3. ผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำทั้ง 5 ชนิด มีค่า LD_{50} จากการกินมากกว่า 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ในหนูขาวพันธุ์ Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, แสดงว่า ผลิตภัณฑ์จากเมล็ดสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) ที่ปลูกในประเทศไทยมีความปลอดภัยค่อนข้างสูง.

4. ผลิตภัณฑ์จากสบู่ดำทั้ง 5 ชนิด มีค่า LD_{50} จากการสัมผัสทางผิวหนังนาน 24 ชั่วโมง มากกว่า 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในหนูขาวพันธุ์ Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, แสดงว่า ผลิตภัณฑ์จากเมล็ดสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) ที่ปลูกในประเทศไทยมีความปลอดภัยค่อนข้างสูง.

5. ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่ 1 และ 2 ขนาดความเข้มข้น 1.5 ppm/ พื้นที่ 0.34 ลูกบาศก์เมตร (1.5 มิลลิกรัม/ลิตร) ไม่มีพิษทางการสูดดมในหนูถีบจักร.

6. ผลจากการป้อนผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่ 1 และ 2 ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ให้หนูขาวทั้งสองเพศวันละครั้งอย่างต่อเนื่องนาน 30 วัน, พบว่า ไม่มีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพแบบรุนแรงของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ปอด, ตับ, ไต, สมอง, รังไข่ และอัณฑะ, เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม. สำหรับผลทางโลหิตวิทยาของหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่ 2 มีค่า MCV (Mean Corpuscle Volume) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.01$). โดยที่กลุ่ม satellite มีค่า MCV ปกติ, แสดงว่า หากได้รับไบโอดีเซล กระบวนการที่ 2 นานต่อเนื่องมากกว่า 30 วัน, อาจมีแนวโน้มทำให้เกิดภาวะ

โลหิตจางได้ เนื่องจากมีค่า MCV สูงในทุกขนาดความเข้มข้น. อย่างไรก็ตาม ผลทางเคมีคลินิกของเลือดและปัสสาวะมีค่าปกติ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม, แสดงว่าไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2 ไม่มีผลต่อการทำงานของตับและไต.

7. ผลจากการป้อนผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่ 1 และ 2 ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ภายใน 24 ชั่วโมง, ไม่มีผลต่อ chromosome aberration แต่มีผลทำให้ค่า Mitotic Index (%) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) ทั้งหนูเพศผู้และเพศเมีย, แสดงว่า ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่มีผลก่อกลายพันธุ์แบบเฉียบพลัน แต่มีผลเป็น cytotoxic (Babu *et. al.* 2008).

8. จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay, พบว่า ความเข้มข้นของไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำกระบวนการที่ 1 และ 2 ที่มีผลทำลายเซลล์กล้ามเนื้อหนู L929 ที่ระดับ 50% (IC_{50}) มีค่า 17.09 %v/v และ 16.36 %v/v, ตามลำดับ, แสดงว่า ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำทั้ง 2 กระบวนการมีผลเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ที่ ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 16 ขึ้นไป.

5. ผลกระทบของโครงการ

ผลจากการศึกษาด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สบู่ดำในครั้งนี้ พบว่าเป็นองค์ความรู้ที่มีผลกระทบต่อด้านต่างๆ ของประเทศทั้งทางตรงและทางอ้อม ดังต่อไปนี้:

1. ด้านเศรษฐกิจ

- ช่วยเพิ่มรายได้ให้เกษตรกรจากการเพาะปลูกต้นสบู่ดำมากขึ้น.
- ช่วยสนับสนุนให้มีการใช้พลังงานทดแทน.

2. ด้านสังคม

- มีความปลอดภัยค่อนข้างสูงต่อสุขภาพของประชากร.
- ส่งเสริมให้วิสาหกิจชุมชนมีรายได้เพิ่มขึ้น.
- ประชากรมีชีวิตและความเป็นอยู่ดีขึ้นจากการพัฒนาสบู่ดำใช้ทดแทนพลังงาน.

3. ด้านสิ่งแวดล้อม

- ช่วยลดภาวะโลกร้อน.
- ลดภาวะมลพิษจากสารคาร์บอนมอนนอกไซด์ในบรรยากาศ.

6. ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากกลีเซอรีนหรือกลีเซอรอลเป็น by-product ที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ กระบวนการที่ 2 ซึ่งเป็นผลผลิตที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมยา, เครื่องสำอาง, อาหาร, โดยเฉพาะอุตสาหกรรมพลาสติกมีการใช้หลายล้านปอนด์ในแต่ละปี (Definition from Answers.com 2010), หากมีการวิจัยและดำเนินการต่อยอดในการผลิตสารดังกล่าว จะสามารถช่วยทดแทนหรือลดการนำเข้าของสารกลีเซอรีนจากต่างประเทศ เนื่องจากสถิติของกรมศุลกากร (Thai Customs Department 2010) พบว่า มีปริมาณการนำเข้ากลีเซอรีนเพิ่มขึ้นมากกว่า 10,000 เท่า ภายใน 3 ปี (พ.ศ. 2549-2551).

2. ควรจะมีการดำเนินการผลิตไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำตามกระบวนการที่ 2 และแยกส่วนของกลีเซอรีน ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์, ซึ่งจะเป็นการทำให้สบู่ดำมีมูลค่าเพิ่มมากขึ้นและถูกนำมาใช้อย่างครบวงจร และเป็นพลังทดแทนอย่างยั่งยืน.

7. เอกสารอ้างอิง

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมยาจุดกันยุง (มอก. 309-2525, UDC 632.951:595.77) ปี 2525 ข้อ 9.5 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน, กระทรวงอุตสาหกรรม, พิมพ์ครั้งที่ 2, หน้า 9-10.

Aplin, THE, 1976. Poisonous Garden Plants and Other Plants Harmful to Man in Australia. *Western Australia Department of Agriculture Bulletin*, p. 3964.

Adam, S. E. I., 1974. Toxic effects of *Jatropha Curcas* in mice. *Toxicology*, **2**, pp. 67-76.

Ahmed, O. M. and Adam, S. E. I., 1979. Toxicity of *Jatropha curcas* in sheep and goats. *Res Vet Sci*, **27**(1) pp. 89–96.

Adler, I. D., 1984. *Cytogenic tests in mammals*. Oxford IRL Press, pp. 275 – 306.

Auletta, C.S., 1995. Acute, Subchronic and Chronic Toxicity. In: CRC Handbook of Toxicology. Michael J. Derelanko and Mannfred A Holinger,eds, *CRC Press*, pp.51-104.

Babu, K., Deepa, M. A., Shankar, S. G. And Rai, S., 2008. Effect of nano-silver on cell division and mitotic chromosomes : A Prefactory Siren. *The Internet Journal of Nanotechnology*. **2**, (2).

Definition from Answers.com. 2010. [Online]. Available from: http://www.answers.com/ topic/glycerol [accessed : 03 June 2010].

Gubitz, G. M, Mittelbach, M, and Trabi, M., 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technol*, **67**, pp.73–82.

Ito, Y., and Ito, M., 2001. Suppressive effect of (-)-Epigallocatechin gallate on aflatoxin B_1-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells. *Journalof Health Science,* **47**(3), pp. 248 – 257.

Joubert, P. H., Brown, J. M. M, Hay, I. T. and Sebata, P. D. B., 1984. Acute poisoning with *Jatropha curcas* (purging nut tree) in children. *South African Medical Journal,* **65,** pp.729-730.

Kandpal, J. B. and Madan M., 1995. *Jatropha curcas*: a renewable source of energy for meeting future energy needs. *Renewable energy*, **6,** pp.159-160.

Makkar, H. P. S., and Becker, K., 2009. *Jatropha curcas* an exciting crop for generation of biofuel and value-added products. *Eur J Lipid Sci Technol* , **11**(8), pp.773–787.

Makkar, H. P. S., *et al*., 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J Agric Food Chem*, **45,** pp. 3152-3157.

Organization for Economic Co-operation and Development., 1997. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects. Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Bone Marrow Cytogenetic Test – Chromosomal Analysis, Test Guideline No. 475.

Organization for Economic Co-operation and Development., 2001. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Method (Limit test), Test Guideline No. 420.

Organization for Economic Co-operation and Development., 2002. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects, Acute Eye Irritation / Corrosion, Test Guideline No. 405.

Panigrahi, S., Francis, B. J., Cano, L. A. and Burbage, M. B., 1984. Toxicity of *Jatropha curcas* seeds from Mexico to rats and mice. *Nutrition-Reports-International*, **29**(5) pp. 1089-1099

Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F., and Shelby, M., 1987. Mammalian *in vivo* cytogenic assays analysis of chromosome aberration in bone marrow cells. *Mutation Research,* **189**, pp. 157 – 165.

Thai Customs Department., 2010. Import-Export Statistics. [online]. Available from : http://www.customs.go.th/statistic, [accessed : 31 May 2010].

United state Environment Protection Agency (EPA)., 1998. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-1100 Acute Oral Toxicity, EPA 712-6-96-190.

United State Environmental Protection Agency (EPA)., 1998. Health effects test guidelines OPPTS 870.5385 Mammalian bone marrow chromosome aberration test.

World Health Organization (WHO). Environmental health criteria 51., 1985. Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals.

ภาคผนวก

ใบรับรองผลการพิจารณาตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

โครงการที่.....17/2550.....

(ออกโดย TISTR-ACUC)

วว.

ผลการพิจารณาตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

ของคณะกรรมการรับผิดชอบและจัดการเรื่องใช้สัตว์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Thailand Institute of Scientific and Technological Research Animal Care and Use committee

(TISTR-ACUC)

.....

ชื่อโครงการ: วิธีการทดสอบความความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนังและปาก, การก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตา, การก่ออาการแพ้, การก่ออาการไข้, การต้านอาการอักเสบและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง...

Project/Protocol Title: ... Acute oral and dermal toxicity test, Skin and eye irritation test, Sensitization test, Pyrogen test, Anti-inflammatory test and Immunomodulating test ...

หัวหน้าโครงการ (Principal Investigator): .....ดร.ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล.....

ที่อยู่ (Address): .....สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย .....

.....35 หมู่ 3 เทคโนธานี, คลอง 5, คลองหลวง.....

.....ปทุมธานี.....12120.....

ผลการพิจารณา

☐ ไม่ผ่าน (Disapproved) ☑ ผ่าน (Approved)

รับรองผลการพิจารณาโดยคณะกรรมการรับผิดชอบและจัดการเรื่องใช้สัตว์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Approved by TISTR-ACUC)

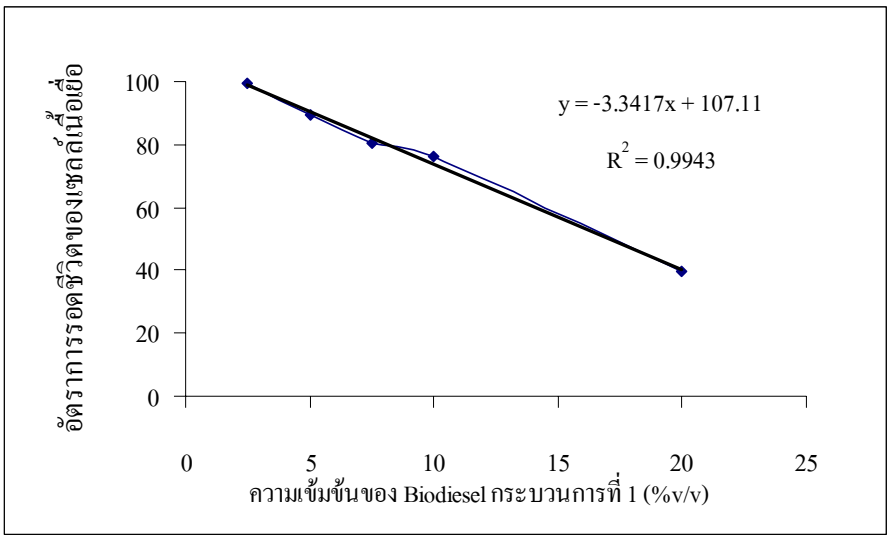
ลงนาม (Signature) ..... วันที่ (Date) 6 ก.พ. 50

(นายทวีศักดิ์ สุนทรธนศาสตร์) ประธานคณะกรรมการ ฯ

ลงนาม (Signature) ..... วันที่ (Date) 6 กุม. 50

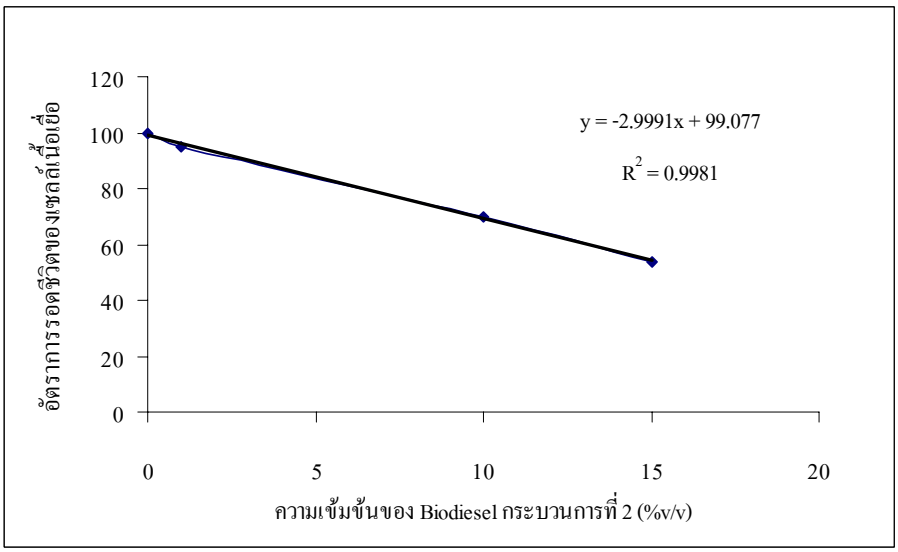
(นางนงลักษณ์ ปานเกิดดี) ผู้ว่าการ วว.

การคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่างต่อการตายของเซลล์กึ่งหนึ่ง (IC_{50})



IC_{50} = 17.09 %v/v

อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อสัมผัสสารทดสอบไบดีเซลกระบวนการที่ 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.



IC_{50} = 16.36 %v/v

อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อสัมผัสสารทดสอบไบโอดีเซลกระบวนการที่ 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ.